



Les variants d'épissage du VEGF-A : leur rôle dans la progression et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques des carcinomes pulmonaires

Asma Boudria

► To cite this version:

Asma Boudria. Les variants d'épissage du VEGF-A : leur rôle dans la progression et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques des carcinomes pulmonaires. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GREN010 . tel-01335533

HAL Id: tel-01335533

<https://theses.hal.science/tel-01335533>

Submitted on 22 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Asma BOUDRIA

Thèse dirigée par **Béatrice Eymin**

Préparée au sein du **Centre de recherche INSERM / UJF U823 à l'Institut Albert bonniot**

Dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

Les variants d'épissage du VEGF-A: leur rôle dans la progression et la réponse aux thérapies anti- angiogéniques des carcinomes pulmonaires

Thèse soutenue publiquement le **13 juin 2014**,
devant le jury composé de :

Président : Dr. Corinne Albiges-Rizo, Grenoble

Rapporteur : Dr. Gilles Pagès, Nice

Rapporteur : Dr. Fabrice Soncin, Lille

Examineur : Dr. Pierre Verrelle, Clermont-Ferrand

Directrice de thèse : Dr. Béatrice Eymin, Grenoble



SOMMAIRE

SOMMAIRE

<u>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</u>	<u>5</u>
<u>RESUME</u>	<u>8</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>9</u>
<u>ABREVIATIONS</u>	<u>10</u>
<u>Publications et formations</u>	<u>12</u>
<u>INTRODUCTION</u>	<u>13</u>
<u>PARTIE I : Les cancers du poumon</u>	<u>13</u>
I.1. Les cancers broncho-pulmonaires : un problème majeur de santé publique.....	13
I.2. Les grands types histologiques des cancers broncho-pulmonaires.....	13
I.3. Les principales anomalies génétiques dans les CBnPCs.....	18
I.4. La prise en charge thérapeutique des CBnPCs.....	21
<u>PARTIE II : L'angiogenèse</u>	<u>24</u>
II.1. L'angiogenèse : rôle dans la physiologie et le développement.....	24
II.2. L'angiogenèse tumorale.....	26
II.3. L'angiogenèse tumorale : perte de l'équilibre fragile entre facteurs pro- et anti-angiogéniques.....	29
II.4. La famille des VEGF	32

II.5. La voie de signalisation dépendante du VEGF-A : ligands et récepteurs.....	35
II.5.1. <i>VEGF-A</i> : un gène hautement régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel	37
II.5.1.1. Régulation transcriptionnelle du <i>VEGF-A</i>	37
II.5.1.2. Régulations post-transcriptionnelles du <i>VEGF-A</i>	39
II.5.2. Les différents variants d'épissage du VEGF-A : structure et fonction.....	39
II.5.2.1. Les différents variants d'épissage VEGF _{xxx} du VEGF-A : structure et biodistribution	40
II.5.2.2. Les différents variants d'épissage VEGF _{xxx} du VEGF-A : fonctions biologiques.....	43
II.5.2.3. Profil d'expression des isoformes VEGF _{xxx}	44
II.5.3. La famille des variants VEGF _{xxx} b : un nouvel acteur encore controversé	45
II.5.3.1. Les variants VEGF _{xxx} b : structure	45
II.5.3.2. Les variants VEGF _{xxx} b : profil d'expression et régulation	47
II.5.3.3. Les variants VEGF _{xxx} b : fonctions biologiques	49
II.5.3.4. Les variants VEGF _{xxx} b : un rôle et une existence encore controversée.....	50
II.5.4. Les récepteurs et co-récepteurs du VEGF-A	51
II.5.4.1. Les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2.....	51
II.5.4.2. Les corécepteurs neuropilines 1 et 2.....	54
II.5.4.3. Les intégrines : de nouveaux corécepteurs pour les VEGFR	57
II.6. Fonctions paracrine et autocrine du VEGF-A : différentes cibles cellulaires et différents effets des variants VEGF _{xxx} et VEGF _{xxx} b	60
II.6.1. Action paracrine sur les cellules endothéliales	60
II.6.1.1. Signalisation dépendante du récepteur VEGFR1.....	61

II.6.1.2. Signalisation dépendante du récepteur VEGFR2.....	63
II.6.2. Les neuropilines : action dépendante ou indépendante des VEGFR	69
II.6.3. Expression tumorale des récepteurs et des corécepteurs : action autocrine du VEGF-A	70
<u>PARTIE III : Les thérapies anti-angiogéniques</u>	76
III.1. Présentation générale des thérapies anti-angiogéniques	76
III.2. Les différentes thérapies anti-angiogéniques.....	77
III.2.1. Thérapies ciblant les ligands.....	77
III.2.2. Thérapies ciblant les récepteurs VEGFR.....	84
III.2.3. Les inhibiteurs peptidiques de l'angiogenèse	85
III.2.4. Thérapies ciblant les corécepteurs.....	89
III.2.5. Thérapies ciblant les différents récepteurs à activité tyrosine kinase.....	90
III.2.6. Les agents désintégrant les vaisseaux VDA	91
III.3. Thérapies anti-angiogéniques : pourquoi ne fonctionnent-elles pas aussi bien qu'espéré ?.....	92
III.3.1. Activation de voies de signalisation alternatives.....	93
III.3.2. Rôle de l'hypoxie et du microenvironnement tumoral.....	94
III.3.3. Modulation de la maturation vasculaire et co-option	95
III.3.4. Acquisition d'un phénotype invasif par les cellules tumorales et sélection de cellules souches cancéreuses.....	95
III.4. Identification de biomarqueurs prédictifs de réponse : une nécessité.....	99
III.4.1. Les biomarqueurs circulants	99
III.4.2. Les biomarqueurs intra-tumoraux.....	101

III.4.3. Un modèle pour sélectionner les patients à traiter.....	101
--	-----

Objectifs des travaux de thèse **104**

Résultats **105**

Article 1.....	105
----------------	-----

Article 2.....	113
----------------	-----

Résultats non publiés	118
-----------------------------	-----

Discussion générale **129**

I. Expression des isoformes VEGF _{xxx} /VEGF _{xxx} b dans les tumeurs humaines : rôle dans la progression des CBnPCs.....	129
---	-----

I.1. Les isoformes du VEGF _{xxx} b : un rôle et une existence controversés.....	129
--	-----

I.2. Quelles sont les isoformes VEGF _{xxx} qui sont réellement exprimées dans les cancers du poumon ?.....	131
---	-----

I.3. Un switch entre les isoformes VEGF _{xxx} et VEGF _{xxx} b : au delà du switch angiogénique.....	132
---	-----

II. Isoformes VEGF _{xxx} et VEGF _{xxx} b : des signalisations distinctes, des partenaires distincts.....	136
--	-----

II.1. VEGF ₁₆₅ b : il signale dans les cellules tumorales dérivées de CBnPCs	136
---	-----

II.2. VEGF ₁₆₅ b : des partenaires distincts pour signaler plus longtemps.....	137
---	-----

III. Boucle autocrine dépendante des VEGF _{xxx} b dans les CBnPCs : un rôle dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques.....	141
--	-----

IV. Le VEGF ₁₆₅ b : un acteur de l'adaptation cellulaire en réponse aux thérapies anti-angiogéniques.....	145
--	-----

V. La signalisation autocrine dépendante des isoformes du VEGF-A : rôle potentiel dans la résistance à d'autres thérapies ciblées.....	145
--	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **148**

ANNEXES **176**

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURES

<u>Figure 1. Incidence des cancers broncho-pulmonaires à travers le monde</u>	<u>p14</u>
<u>Figure 2. Principales lésions génétiques observées dans les CBnPCs</u>	<u>p20</u>
<u>Figure 3. Algorithme de traitement pour les CBnPCs</u>	<u>p22</u>
<u>Figure 4. Les étapes de l'angiogenèse physiologique</u>	<u>p25</u>
<u>Figure 5. Organisation de la vasculature et structure des vaisseaux dans les états normaux et pathologiques</u>	<u>p28</u>
<u>Figure 6. Régulateurs endogènes de l'angiogenèse tumorale</u>	<u>p31</u>
<u>Figure 7. Membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs</u>	<u>p33</u>
<u>Figure 8. Effets induits par le VEGF-A durant l'angiogenèse</u>	<u>p36</u>
<u>Figure 9. Représentation schématiques des domaines fonctionnels encodés par les différents exons du gène du VEGF-A</u>	<u>p38</u>
<u>Figure 10. Structure du gène du <i>VEGF-A</i> humain et exons composant les différents isoformes</u>	<u>p42</u>
<u>Figure 11. La structure de la séquence d'acides aminés de l'extrémité 3' des isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b</u>	<u>p46</u>
<u>Figure 12. Régulation de l'épissage alternatif du VEGF</u>	<u>p48</u>

Figure 13. Représentation schématique de la structure du mécanisme d'activation du VEGFR	p 52
Figure 14. Schéma général de la structure des neuropilines et des domaines de liaison à leurs principaux ligands	p 54
Figure 15. Les différentes familles de ligands interagissant avec les neuropilines et les divers effets en découlant	p56
Figure 16. Représentation scématique des voies de signalisation activées suite à une collaboration VEGFR2/ intégrine $\beta 3$ dans les cellules endothéliales	p58
Figure 17. Représentation schématique des effets induits par la signalisation en aval des VEGF récepteurs dans les CEs	p60
Figure 18. Interaction des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} avec leur récepteur VEGFR2 dans la cellule endothéliale	p62
Figure 19. Les principaux sites de phosphorylation dans les VEGFRs et leurs effets	p65
Figure 20. Schéma général du trafic membranaire et de la signalisation dépendante du VEGFR et des NRPs	p68
Figure 21. Effets autocrines du VEGF sur les cellules tumorales	p72
Figure 22. Fonction autocrine du VEGF dans les cellules tumorales	p74
Figure 23. Vue générale des mécanismes d'action des agents anti-angiogéniques	p78
Figure 24. Mécanismes d'action proposés pour le Bevacuzimab	p83
Figure 25. Différents types de résistances aux traitements anti-angiogéniques	p98
Figure 26. L'expression des différents isoformes du VEGF-A et de leurs récepteurs en tant que biomarqueurs de réponse au BVZ	p103
Figure 27. Variations des transcrits des VEGFRs et des NRPs après traitement au BVZ ou au VEGF_{165b}	p119
Figure 28. Profils de cytokines exprimées et secrétées dans les lignées H358 et H1299 et clones dérivés	p121

<u>Figure 29. Mesure du VEGF-C dans le surnageant de cellules H358 traitées au BVZ</u>	<u>p122</u>
<u>Figure 30 . Evaluation de la résistance à l'hypoxie <i>in vitro</i></u>	<u>p123</u>
<u>Figure 31. Taux de VEGF₁₆₅b et de VEGF_{total} dans les sérums humains provenant de donneurs sains</u>	<u>p125</u>
<u>Figure 32. Organigramme d'immunisation des lapins pour l'obtention de l'anticorps VEGF₁₆₅</u>	<u>p127</u>
<u>Figure 33. Tests de réactivité de l'anticorps anti-VEGF₁₆₅</u>	<u>p128</u>
<u>Figure 34. Rôle du « switch » entre les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b au cours du développement tumoral</u>	<u>p135</u>
<u>Figure 35. Mécanismes d'activation potentiels de l'intégrine β1 suite à la liaison du VEGF₁₆₅b</u>	<u>p140</u>
<u>Figure 36. Promotion de la signalisation autocrine dépendante du VEGF₁₆₅b dans les CBnPCs par le BVZ</u>	<u>p144</u>

TABLEAUX

<u>Tableau 1. Correspondances entre la classification TNM et les stades anatomiques</u>	<u>p17</u>
<u>Tableau 2. Expression des VEGFRs et des NRPS dans les tumeurs humaines</u>	<u>p71</u>
<u>Tableau 3 : Les toxicités associées au traitement par BVZ</u>	<u>p80</u>
<u>Tableau 4. Différentes catégories d'agents anti-angiogéniques approuvés ou en essais cliniques</u>	<u>p88</u>

RESUME/ABSTRACT

RESUME

Le VEGF-A est l'un des facteurs de croissance les plus importants au cours de la néo-angiogenèse tumorale. Ce rôle en a fait une cible de choix pour le développement de thérapies. Ainsi, différents médicaments le ciblant (Bevacizumab, Avastin[®]) ou ciblant ses voies de signalisation (inhibiteurs des récepteurs VEGFR) sont actuellement utilisés en clinique, notamment dans les adénocarcinomes pulmonaires. Cependant, malgré des résultats initiaux prometteurs, un grand nombre de patients apparaissent d'emblée résistants ou échappent à ces thérapies, voir même développent des tumeurs plus agressives. A ce jour, il n'existe aucun moyen d'identifier les patients susceptibles de répondre à ces thérapies. Récemment, de nouveaux variants d'épissage du *VEGF-A* issus d'un épissage alternatif différentiel au niveau du dernier exon ont été identifiés, les isoformes VEGF_{xxx}b. A l'inverse des VEGF_{xxx}, ces variants sont anti-angiogéniques. Si les effets paracrines des isoformes du VEGF-A sur les cellules endothéliales ont été bien caractérisés, bien peu d'études se sont penchées sur leurs effets autocrines sur les cellules tumorales qui expriment à leur surface les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Dans ce contexte, le but principal de notre étude était de déterminer le statut d'expression et les fonctions biologiques de l'isoforme VEGF₁₆₅b dans les tumeurs primaires et dans des modèles cellulaires dérivés de Carcinomes Pulmonaires Non à Petites Cellules (CBnPCs). Nos résultats identifient des profils d'expression variables du VEGF₁₆₅b chez les patients atteints de CBnPCs, et montrent que de hauts niveaux intratumoraux de VEGF₁₆₅b sont associés à un envahissement ganglionnaire. De plus, nos résultats identifient une boucle autocrine au travers de laquelle l'activation des récepteurs VEGFR1/VEGFR2 par le VEGF₁₆₅b conduit à l'apparition de cellules tumorales présentant un phénotype plus invasif. Finalement, nous montrons que le traitement des cellules tumorales par le Bevacizumab (BVZ) mais aussi par les sels de platine auquel il est associé en clinique augmente l'expression du VEGF₁₆₅b, la signalisation autocrine qu'il active et conduit à l'apparition de cellules tumorales plus agressives et résistantes à l'apoptose induite par le cisplatine. Ces résultats sont la première démonstration de la capacité du VEGF₁₆₅b à signaler sur les cellules tumorales. Dans une seconde étape de notre travail, nous avons étudié le rôle que pourraient jouer les intégrine β 1 et β 3 dans le maintien de la signalisation induite par le VEGF₁₆₅b dans les cellules de CBnPCs. Nous montrons que le VEGF₁₆₅b active l'intégrine β 1. Cette activation aboutit à un réarrangement du cytosquelette d'actine en fibres de stress, ce qui pourrait favoriser la migration de ces cellules. De manière intéressante, le BVZ est capable d'induire ce même phénotype par un mécanisme nécessitant l'expression du VEGF₁₆₅b, de l'intégrine β 1, mais aussi de l'intégrine β 3. La formation de ces fibres de stress est associée à l'activation de voies de signalisation d'aval mettant en jeu la phosphorylation des protéines FAK et cofiline. De plus, nous mettons en évidence l'existence de complexes entre la neuropiline 2 et l'intégrine β 1 dans les cellules de CBnPCs qui seraient susceptibles de participer à l'activation de ces voies. Ainsi, le VEGF₁₆₅b et le BVZ apparaissent capable de signaler à travers les intégrines β 1 et β 3 dans les cellules de CBnPCs, suggérant un rôle de ces intégrines dans la réponse des cellules tumorales aux thérapies anti-angiogéniques. En conclusion, nos résultats identifient un rôle du variant VEGF₁₆₅b dans la progression des CBnPCs et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques et aux chimiothérapies, ce qui suggère que le VEGF₁₆₅b pourrait être un marqueur réponse au BVZ dans les CBnPCs.

Mots clé : VEGF₁₆₅b, bevacizumab, CBnPC, intégrine β 1, marqueur de réponse.

ABSTRACT

VEGF-A is one of the most important factors during tumor neoangiogenesis. This role has made it a prime target for the development of therapies. Thus, various drugs targeting VEGF-A (Bevacizumab, Avastin®) or its signaling pathways (VEGFR inhibitors) are currently used in clinical practice, especially in lung adenocarcinomas treatment. However, despite promising initial results, many patients are refractory or escape these therapies, and sometimes, even develop more aggressive tumors. To date, there is no means to identify patients who are likely to respond these treatments. Recently, new splicing variants of *VEGF-A* resulting from an alternative splicing at the last exon, were identified and called VEGF_{xxx}b. Unlike VEGF_{xxx}, these variants are antiangiogenic. If paracrine effects of VEGF-A isoforms on endothelial cells have been well characterized, few studies have examined their autocrine effects on tumor cells expressing VEGFR1 and VEGFR2. In this context, the main aim of our study was to determine the expression status and biological functions of VEGF₁₆₅b in primary tumors and derived cell models of non small cell lung carcinoma (NSCLC). Our results identify variable expression profiles of VEGF₁₆₅b in NSCLC patients, and show that high levels of intratumoral VEGF₁₆₅b are associated with lymph node metastases. Furthermore, our results identify an autocrine loop through which the VEGFR1/VEGFR2 activation by VEGF₁₆₅b leads to the appearance a more invasive phenotype on tumor cells. Finally, our results show that treatment of tumor cells by Bevacizumab (BVZ) but also platinum salts, with which it is associated clinics, increases VEGF₁₆₅b expression and autocrine signaling, which leads to appearance of tumor cells that are more aggressive and resistant to cisplatin-induced apoptosis. These results are the first evidence of the VEGF₁₆₅b ability to signalize on tumor cells. In a second stage of our work, we investigated the potential role of β 1 and β 3 integrins in maintaining VEGF₁₆₅b signaling in NSCLC cells. We show that VEGF₁₆₅b activates β 1 integrin. This activation leads to a rearrangement of the actin cytoskeleton in stress fibers, which may promote tumor cell migration. Interestingly, BVZ is able to induce this same phenotype by a mechanism requiring the expression of VEGF₁₆₅b , β 1 integrin and β 3 integrin. The formation of these stress fibers is associated with the activation of downstream signaling pathways involving proteins phosphorylation of FAK and cofilin. In addition, we highlight the existence of neuropilin-2/ β 1 integrin complexes in NSCLC cells, which are likely to participate in these pathways activation. Thus, VEGF₁₆₅b and especially BVZ appear able to signal through β 1 and β 3 integrins NSCLC cells, suggesting a role of these integrins in tumor cells response to antiangiogenic therapies. In conclusion, our results are the first evidence of a role of VEGF₁₆₅b in NSCLC progression and response to antiangiogenic therapies and chemotherapies; they suggest that VEGF₁₆₅b could be a marker of response to BVZ in NSCLC.

Key words: VEGF₁₆₅b, Bevacizumab, NSCLC, β 1 integrin, marker of response.

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

ALK: Anaplastic lymphoma kinase
 ARE : AU-Rich Element
 ARN: Acide ribonucléique
 ARNi: ARN interference.
 ARNm: ARN messenger
 ATP: Adenosine triphosphate
 AUF1: AU-rich element RNA-binding protein 1
 BMDCs : Bone Marrow derived cells
 BVZ: Bevacizumab
 CA9: Carbonic Anhydrase 9
 CBnPC: cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules
 CBPC: cancers broncho-pulmonaires à petites cellules
 CEs: cellules endothéliales
 DSS, Distal Splice Site
 E2F1: E2F factor 1
 ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
 EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
 EML4: Echinoderme Microtubule associated protein-Like 4
 EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition
 ERCC1: excision repair cross-complementing 1
 ERK: Extracellular-Signal-Regulated kinases

ESE: Exonic Splicing Enhancer
 FAK: Focal Adhesion Kinase
 FDA: Federal Drug Administration
 FGF: Fibroblast Growth Factor
 FGFR: fibroblast growth factor receptor
 FIH: Factor Inhibiting HIF
 Flk-1: Fetal Liver Kinase 1
 Flt-1: Fms-Like Tyrosine Kinase
 FL T3: Fms-related Tyrosine kinase 3
 FOLFOX: 5-Fluoracil, Leucovorin and Oxaliplatin
 HGF: Hepatocyte Growth Factor
 HIF: Hypoxia Inducible Factor
 hnRNPL: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
 HREs: Hypoxia-Response Elements
 HSPGs: Heparan Sulfate Protéoglycans
 HuR: human antigen R
 Ig : Immunoglobulin
 IGF-1: Insulin Growth Factor-1
 IGF1R: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
 IHC: immunohistochimie
 IL: Interleukine-1 α
 InVS: Institt de veille sanitaire
 IRES : Internal Ribosome Entry Site
 KDR: Kinase insert Domain Receptor
 MAPK: Mitogen-activated protein kinase
 MDM2: Mouse double minute 2 homolog
 MEC: Matrice Extracellulaire
 mTOR: Mammalian target of Rapamycin
 NRP: Neuropiline
 OMS: organisation mondiale de la santé

PAIP2: Poly(A)-Binding Interacting Protein 2

PDGF: Platelet-derived Growth Factor

PDGFR: Platelet-derived Growth Factor

PHD: prolyl hydroxylase domain containing protein

PI3K: Phosphoinositide-3-Kinase

PIGF: Placental Growth Factor

PKC: Protein kinase C

PLCy: Phospholipase-Cy

PSS: Proximal Splice Site

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B

RRM1: Ribonucleoside-diphosphate reductase 1

SEMA3: Sémaforine de classe 3

SR: Serine/Arginine Rich protein

SRPK: Serine/arginine-Rich Protein Kinase

SRSF : Serine/Arginine-rich Splicing Factor

TGF: tumor Growth factor

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TK : Tyrosine Kinase

TKI: tyrosine kinase inhibitor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TSP1: Thrombospondine-1

TTP: Tristetraproline

U2AF1: U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

UICC: Union for International Cancer Control

UPA: Urokinase-type Plasminogen Activator

UTR: Untranslated Region

VDA: Vascular Disrupting Agent

VEGF: Vascular Endothelial Growth factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth factor Receptor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL: Von Hippel-Lindau

WT1: Wilms Tumor

Publications et formations

I. Formations

Titulaire du niveau I en expérimentation animale.

II. Communications

1. The VEGF-A splice variants VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} Differentially control the proliferation of non small cell lung carcinoma cells. EACR 22- Barcelone 7-10 July 2012
2. The VEGF-A splice variants VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} differentially control the proliferation/survival of non small cell lung carcinoma cells. 4^{ème} Congrès de la Société Française d'Angiogenèse. Monte-Carlo 28-30 october 2012
3. VEGF_{165b}: un marqueur de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les cancers du poumon. JRM 2013, journée de la recherche médicale- Grenoble- 7 juin 2013
4. VEGF_{165b}: un marqueur de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les cancers du poumon. J2R, journées de la recherche respiratoire - Montpellier 11 octobre 2013.

III. Publications

1. Gout, S., Brambilla, E., Boudria, A., Drissi, R., Lantuejoul, S., Gazzeri, S., Eymin, B., 2012. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. PLoS One 7, e46539. doi:10.1371/journal.pone.0046539. **(publié)**
2. B. Eymin, A. Boudria and C. Abou-Fayçal, VEGF-A splice variants: do they play a role in tumor response to anti-angiogenic therapies? . Molecular Mechanisms of Angiogenesis: From ontogenesis to oncogenesis. J.-J. Feige et al. (eds.), Molecular Mechanisms of Angiogenesis, DOI 10.1007/978-2-8178-0466-8_21, © Springer-Verlag France 2014. **(Accepté)**
3. Elodie de Laplanche, Asma Boudria, Estelle Dacheux, Anne Vincent, Nicolas Gadot, Fouzia Assade, Katy Le Corf, Xavier Leroy, Florence Mège, Lechevallier, Béatrice Eymin, Nicole Dalla Venezia, Hélène Simonnet. Low glucose microenvironment of normal kidney cells stabilizes a subset of messengers involved in angiogenesis, including VEGFA and HIF1A. PloS One. **(En révision)**
4. Asma Boudria, Stephanie Gout, Michelle Keramidas, Stefania Dermendjieva, Jean-Luc Coll, Sylvie Lantuejoul, Elisabeth Brambilla, Sylvie Gazzeri and Beatrice Eymin. Pre-mRNA alternative splicing controls VEGF-A autocrine functions and response to Bevacizumab in Non Small Cell Lung Carcinoma. **(soumis et pas encore rejeté)**
5. Asma Boudria, Eva Faurobert, Corinne Albiges-Rizo, Sylvie Gazzeri and Beatrice Eymin. Anti-angiogenic therapies regulate tumor cells spreading and actin polymerization through VEGF_{165b}-regulated $\beta 1/\beta 3$ integrins. **(En préparation)**

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE I : Les cancers du poumon

I.1. Les cancers broncho-pulmonaires : un problème majeur de santé publique

Les cancers du poumon sont considérés comme les plus mortels parmi les cancers avec plus de 1,38 million de morts à travers le monde par an (Figure 1). En 2010, 222 520 nouveaux cas de cancers du poumon ont été détectés, et 157 300 cas de décès ont été enregistrés. La plupart des patients sont généralement diagnostiqués à des stades avancés, avec seulement 20 à 30% des patients éligibles pour une résection chirurgicale de la tumeur, et subissent des traitements systémiques avec une survie globale de 7 à 12 mois après un traitement chimiothérapeutique en première ligne (Jemal et al., 2008). Le taux de survie à 5 ans est donc inférieur à 15% aux Etats-Unis et à 10% en Europe (Parkin et al., 2005). La survie globale est très corrélée au stade, les patients de stade IA présentant une survie à 5 ans de 70%, qui chute à 40% pour les stades II, contre 5% pour les stades métastatiques. En France, l'incidence des cancers du poumon vient en première position avec 56 800 nouveaux cas en 2012 et 21 300 décès (InVS, 2012). Ces données démontrent que les cancers du poumon constituent un problème majeur de santé publique. Parmi les facteurs de risque, l'exposition tabagique joue un rôle fondamental. Ainsi, en 2000, il a été estimé que 85% des cas mondiaux de cancer du poumon chez l'homme étaient liés au tabac, atteignant même 95% en Europe, et 49% chez la femme (Fry et al., 1999). Le risque relatif dépend de la quantité consommée et décroît avec un arrêt de la consommation pour se stabiliser à une valeur inférieure à 2, comparativement au risque 1 chez le non-fumeur, 20 ans après le sevrage tabagique. Pour le tabagisme passif, le risque relatif a été évalué à 1,4% (Williams and Sandler, 2001). Parallèlement au tabac, d'autres facteurs environnementaux ont été incriminés dans la survenue des cancers du poumon, notamment l'exposition à des substances telles que l'amiante, l'arsenic, le nickel ou le cadmium (Brüske-Hohlfeld, 2009). La prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers du poumon s'est nettement améliorée ces dernières années grâce à l'apparition de la

notion de « thérapies personnalisées ». Ces thérapies prennent mieux en compte les caractéristiques spécifiques des tumeurs.

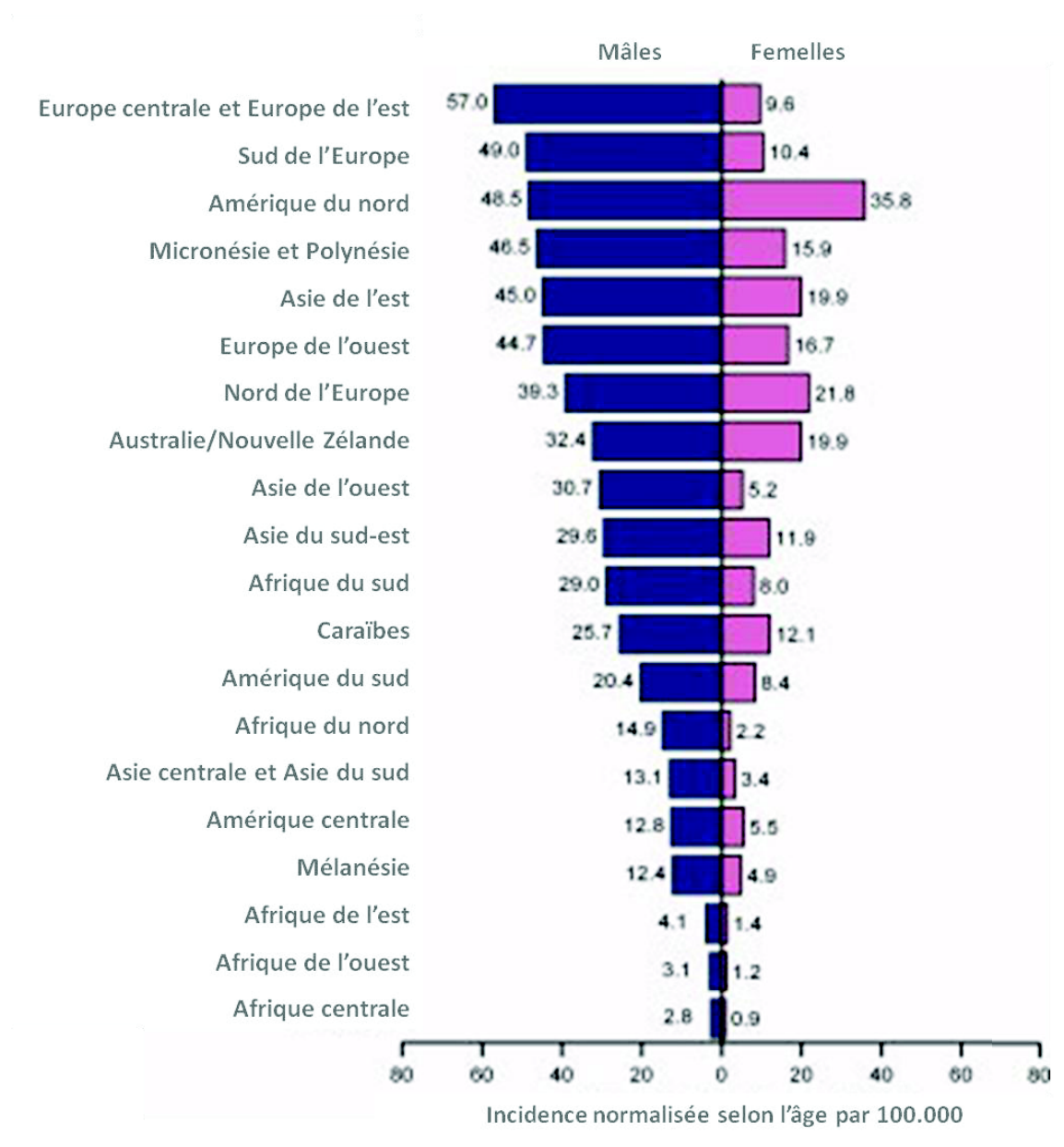


Figure 1. Incidence des cancers broncho-pulmonaires à travers le monde (*d'après Jemal et al., 2011*)

I.2. Les grands types histologiques des cancers broncho-pulmonaires

Jusqu'à très récemment, il existait deux approches principales dans la classification des cancers du poumon. La première approche prend en considération les caractéristiques histologiques des tumeurs et a été publiée pour la première fois par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1967, puis modifiée en 1981, 1999 et 2004. Seule cette dernière version intègre certaines caractéristiques génétiques et cliniques de la tumeur et redéfinit les critères diagnostiques des lésions prénéoplasiques bronchiques (Beasley et al., 2005). En se basant essentiellement sur des critères histologiques, la classification selon l'OMS a l'avantage d'être simple et reproductible, car elle classe les tumeurs selon leur grade de différenciation :

- Grade I : tumeurs peu différenciées
- Grade II : tumeurs moyennement différenciées
- Grade III : tumeurs fortement différenciées

Sur la base de cette classification, les tumeurs pulmonaires sont divisées en deux principaux sous-groupes. Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC), qui représentent environ 15% des cancers du poumon, sont des tumeurs neuroendocrines très agressives pour lesquelles il n'y a toujours pas de traitement (Zhang and He, 2013). Le deuxième sous-groupe est celui des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBnPC) qui représentent environ 80% de ces cancers, les sous-types histologiques les plus fréquents étant les adénocarcinomes (32% à 40%), les carcinomes squameux (25 à 30%) et les carcinomes à grandes cellules (8 à 16%) (Zarogoulidis et al., 2013). Les adénocarcinomes sont le sous-type histologique le plus fréquemment diagnostiqués dans de nombreux pays et notamment aux Etats-Unis où ils représentent 60% des cancers pulmonaires. Leur incidence a augmenté ces 20 dernières années en Europe chez l'homme mais surtout chez la femme. C'est la forme prédominante de cancer chez les hommes de moins de 50 ans, chez les femmes quelque soit leur âge, chez les non-fumeurs et les ex-fumeurs. Ils sont puissamment associés au tabagisme puisque 80% des adénocarcinomes s'observent chez les fumeurs. Ce sont des tumeurs épithéliales présentant une différenciation glandulaire ou une sécrétion de mucines par les cellules tumorales, dont plusieurs variantes histologiques ont été décrites dont la forme bronchioloalvéolaire correspondant à une forme non invasive pure et dont le pronostic de survie à 5 ans est de 100% (Imielinski et al., 2012). La découverte des mutations activatrices touchant le récepteur à activité tyrosine kinase EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

dans les adénocarcinomes pulmonaires a fait émerger une cible thérapeutique fondamentale dans ce sous-type histologique. Les carcinomes squameux sont des tumeurs malignes dont la synthèse de kératine par les cellules tumorales est l'une des caractéristiques principales. La différenciation squameuse se manifeste également par la présence de grandes cellules quadrangulaires unies par des ponts d'union. Le degré de kératinisation et la présence ou non de ces ponts définit le degré de différenciation de ces carcinomes squameux.

La seconde approche dans la classification des cancers broncho-pulmonaires a été décrite par l'UICC (*Union for International Cancer Control*) il y a plus de 50 ans. Cette classification dite « TNM » prend essentiellement en compte les caractéristiques anatomiques des tumeurs. Les trois aspects sur lesquels repose cette classification sont :

- T : Taille de la tumeur dans son site primaire.
- N : Degré d'envahissement des ganglions lymphatiques avoisinants.
- M : Présence ou absence de foyers métastatiques.

Ce système permet d'évaluer, à travers divers examens (microscopie, imagerie), l'évolution des cancers et leur éventuelle propagation dans l'organisme. Afin de simplifier l'utilisation de ce système (Tableau 1), les catégories peuvent être regroupées pour donner une classification par stade anatomique :

- Stade 0 : Cancer in situ.
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastases à distances.
- Stade II : Extension très locale et/ou atteinte ganglionnaire minime.
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire importante.
- Stade IV : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire majeure.
- Stade V: Tumeurs avec métastases.

	N0	N1	N2	N3
T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1		IV	IV	IV

Tableau 1. Correspondances entre la classification TNM et les stades anatomiques (*D'après Goldstraw et al., 2007*)

Comme nous venons de le voir, les deux types de classification des cancers du poumon reposent principalement sur des critères morphologiques, histologiques et anatomo-pathologiques. Les récentes avancées technologiques, (analyses « omic ») permettant d'étudier à large échelle les caractéristiques génétiques et épigénétiques des tumeurs (séquençage à haut débit, analyses transcriptomiques, analyses protéomiques et métabolomiques), conjuguées aux avancées concernant la prise en charge des patients atteints de cancers et au développement des thérapies ciblées créent aujourd'hui un réel besoin d'une nouvelle classification qui ne serait pas uniquement fondée sur des critères histopathologiques, mais plutôt sur une approche pluridisciplinaire qui intégrerait les caractéristiques génétiques et épigénétiques propres des tumeurs (Travis et al., 2013). Cette nouvelle approche devrait permettre, d'une part, de potentialiser l'efficacité de certaines thérapies en permettant une meilleure sélection des patients à traiter, et d'autre part de minimiser les toxicités liées aux traitements.

I.3. Les principales anomalies génétiques dans les CBnPCs

Le cancer broncho-pulmonaire est un processus dégénératif résultant de l'accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, de multiples anomalies génétiques, épigénétiques et post-traductionnelles des protéines qui dérèglent par étapes successives (carcinogenèse multi-étape) les mécanismes de contrôle de la croissance des cellules épithéliales de l'arbre bronchique. Sur le plan morphologique, ces anomalies résultent d'une très forte instabilité génétique induisant une transformation progressive de l'épithélium normal bronchique en épithélium hyperplasique, dysplasique puis en carcinome *in situ* et carcinome invasif (Osada and Takahashi, 2002). D'une manière générale, les altérations génétiques les plus précoces ne s'accompagnent pas d'anomalies morphologiques (Shivapurkar et al., 2000). C'est seulement à la suite d'une accumulation d'un nombre critique d'anomalies génétiques que les stades morphologiques précoces sont diagnostiqués (Wistuba et al., 2000). Ce modèle de carcinogenèse broncho-pulmonaire corrèle avec le modèle proposé par Hanahan et Weinberg selon lequel les anomalies génétiques sont responsables de l'acquisition par la cellule épithéliale normale de différentes propriétés qui vont la transformer en cellule tumorale (échappement aux inhibiteurs de croissance, maintien des signaux de prolifération, dérégulation du métabolisme, résistance à la mort cellulaire, instabilité génétique, échappement au système immunitaire, acquisition de propriétés invasives et métastatiques...) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Plusieurs altérations génétiques ont été détectées chez un nombre important de patients atteints de CBnPCs. L'identification de ces altérations et une meilleure connaissance de leur impact sur les cellules tumorales ont conduit à l'élaboration de thérapies ciblées. Ces anomalies consistent en des amplifications, translocations ou mutations. Cependant, comme le montre la Figure 2, les anomalies génétiques ne sont pas les mêmes selon que l'on ait affaire à un adénocarcinome ou à un carcinome squameux, et sont actuellement mieux caractérisées dans les adénocarcinomes comparativement aux carcinomes squameux. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des médiateurs clés de plusieurs processus cellulaires fondamentaux, qui contrôlent notamment les voies de survie et de prolifération. Leur activation anormale est essentielle au déclenchement de la tumorigenèse. Des mutations activatrices de l'EGFR, dont les plus communes sont les mutations L858R et del19 (délétion de quelques acides aminés au niveau de l'exon 19), sont retrouvées dans 26 % des

adénocarcinomes pulmonaires. L'incidence de ces mutations dépend des variations ethniques, variant de 10 % chez les patients aux Etats-Unis à 30-50 % chez les patients en Asie de l'Est (Stella et al., 2013; Tan et al., 2014). Les cellules de CBnPCs possédant ces mutations deviennent complètement dépendantes (on parle d'addiction) aux signaux de survie provenant de l'hyperactivation de l'EGFR (Sharma et al., 2006), ce qui les rend très sensibles aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ce récepteur (EGFR-TKI) comme le Gécitinib ou l'Erlotinib qui sont actuellement utilisés en première ligne de traitement (Ulivi et al., 2013). La détection de ces mutations constitue aujourd'hui un moyen de sélectionner une population de patients susceptibles de bénéficier au mieux d'une thérapie utilisant les EGFR-TKI. Malgré les progrès dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement tumoral, la réponse aux thérapies ciblées reste cependant transitoire, car des résistances à ces thérapies se développent très rapidement.

Le succès des EGFR-TKIs dans le traitement des patients atteints de CBnPCs non squameux et présentant des mutations de l'EGFR a constitué une vraie révolution qui a incité les chercheurs à caractériser d'autres anomalies moléculaires des adénocarcinomes pulmonaires. Ces recherches ont conduit à l'identification de réarrangements qui surviennent au niveau du gène de la kinase du lymphome anaplasique (ALK) dans 2 à 5% des CBnPCs. Ce réarrangement se produit indépendamment des mutations de l'EGFR et de KRAS et consiste en une inversion du chromosome 2 conduisant à une fusion avec le gène EML4 (*Echinoderme Microtubule associated protein-Like 4*). Cela conduit à une expression et une activation anormales de cette protéine tyrosine kinase dans le cytoplasme des cellules cancéreuses (Gridelli et al., 2014). Dans une étude de phases I et II, le crizotinib (inhibiteur de Met et de ALK) a démontré une bonne réponse et une bonne tolérance chez les patients atteints de CBnPC avancés possédant un réarrangement de ALK (Seto et al., 2013). Ainsi, à l'heure actuelle, les deux approches moléculaires consistant à cibler EGFR et ALK permettent de faciliter les traitements de certains sous-types tumoraux d'adénocarcinomes. A l'inverse, très peu de choses sont connues concernant le profil mutationnel des carcinomes squameux. Des amplifications du FGFR1 dans environ 16% des carcinomes spinocellulaires, ainsi que de PIK3CA, ont été rapportées. D'autre part, des mutations du suppresseur de tumeur PTEN, qui régulent négativement PIK3CA, ont été rapportées dans environ 10% des carcinomes squameux (Stella et al., 2013).

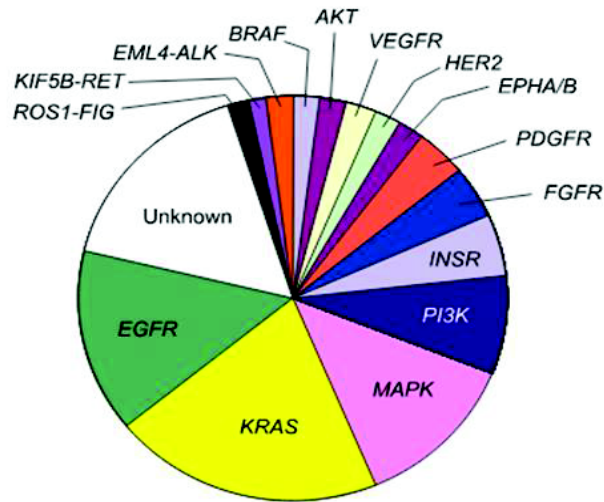
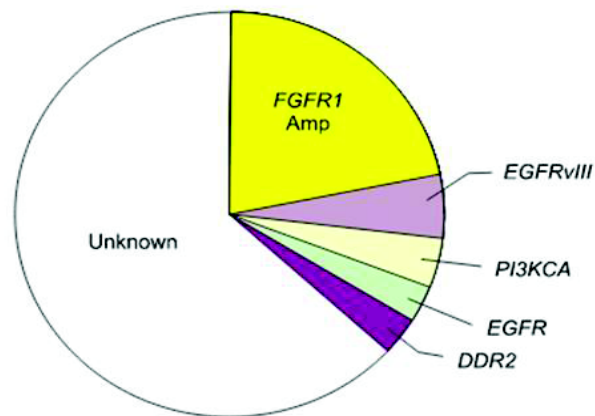
A**B**

Figure 2. Principales lésions génétiques observées dans les CBnPCs. A. Altérations génétiques présentes au niveau des adénocarcinomes. **B.** Lésions génétiques connues dans les carcinomes squameux (*D'après Wistuba, 2012*).

Globalement, et d'après une étude très récente du profil mutationnel des CBnPC, les gènes les plus fréquemment mutés seraient : KRAS (23.2 %), EGFR (21.3%), TP53 (12.6%), MET (7%), STK11 (5.7%), PIK3CA (3.5 %), ERBB2 (0.9 %), BRAF (0.9%) et AKT1 (0.4%) (Tan et al., 2014). De plus, une étude récente effectuée sur 183 adénocarcinomes pulmonaires a identifié par séquençage à large échelle de nouvelles mutations affectant les gènes BRD3, U2AF1, SETD2, TBM10, ARID1A et SMARCA4. Ces mutations seraient impliqués dans le

contrôle de régulations épigénétiques et de contrôle de l'expression des ARN (Imielinski et al., 2012). Même s'il reste à déterminer les conséquences biologiques de ces anomalies, ces données ouvrent de nouvelles perspectives en termes d'identification de cibles thérapeutiques.

I.4. La prise en charge thérapeutique des CBnPCs

Une fois que le diagnostic est établi, les patients qui sont jugés aptes à subir une intervention chirurgicale vont subir le traitement le plus radical qu'est l'exérèse (Figure 3). Généralement, il est préconisé de procéder à une lobectomie ou à une résection plus importante plutôt que de recourir à des résections sub-lobaires. Par contre, pour des patients atteints de CBnPCs de stade I, pour lesquels une opération chirurgicale n'est pas contre-indiquée mais pour lesquels une lobectomie ou une résection plus large ne peut être envisagée en raison d'une maladie comorbide ou d'une diminution des fonctions respiratoires, il est recommandé de procéder à des segmentectomies au lieu de recourir à des interventions non chirurgicales. Par la suite, la marche à suivre dépendra de l'étendue de la maladie, des données postopératoires et des préférences des patients. Les études menées jusqu'à présent n'ont pas démontré l'efficacité de l'usage des thérapies néo-adjuvante ou adjuvante, ni de radiothérapies chez les patients atteints de CBnPCs en stade I.

Les patients de stade II sont candidats à des stratégies de traitement multidisciplinaires. Pour les patients ayant subi une résection importante d'une tumeur en stade II, un traitement chimiothérapeutique adjuvant basé sur l'utilisation de sels de platine est recommandé 4 à 8 semaines après la chirurgie si le patient est en bonne condition physique. Les patients pour qui la chirurgie représente des risques de comorbidité, sont traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie. La radiothérapie en traitement adjuvant est à proscrire dans les cas de patients ayant subi une résection importante d'une tumeur en stade II et présentant un envahissement ganglionnaire (N₁). Lorsque les patients sont aux stades IIIA₁ et IIIA₂ de la maladie, ils doivent subir une lymphadénectomie médiastinale, c'est-à-dire une ablation des nœuds lymphatiques du médiastin, et un traitement adjuvant radio-chimiothérapeutique basé sur les sels de platine doit être mis en place après l'opération. Une approche multidisciplinaire s'impose dans les cas de patients en stade IIIA₃ et IIIA₄, qui peuvent être traités par chimiothérapies d'induction suivies d'une chirurgie puis d'un traitement chimio-

radiothérapeutique qui repose sur l'usage de sels de platine. Certains patients en stade IIIB, jugé aptes, pourront être redirigés vers un traitement chirurgical associé à une chimiothérapie. Cependant, dans la majorité des cas, pour ces patients en stade IIIB et en Stade IV, le but des traitements est de prolonger la survie et de pallier aux symptômes. Le traitement à ces stades consiste en une combinaison de sels de platines avec d'autres agents dit de 3^{ème} génération (Zarogoulidis et al., 2013).

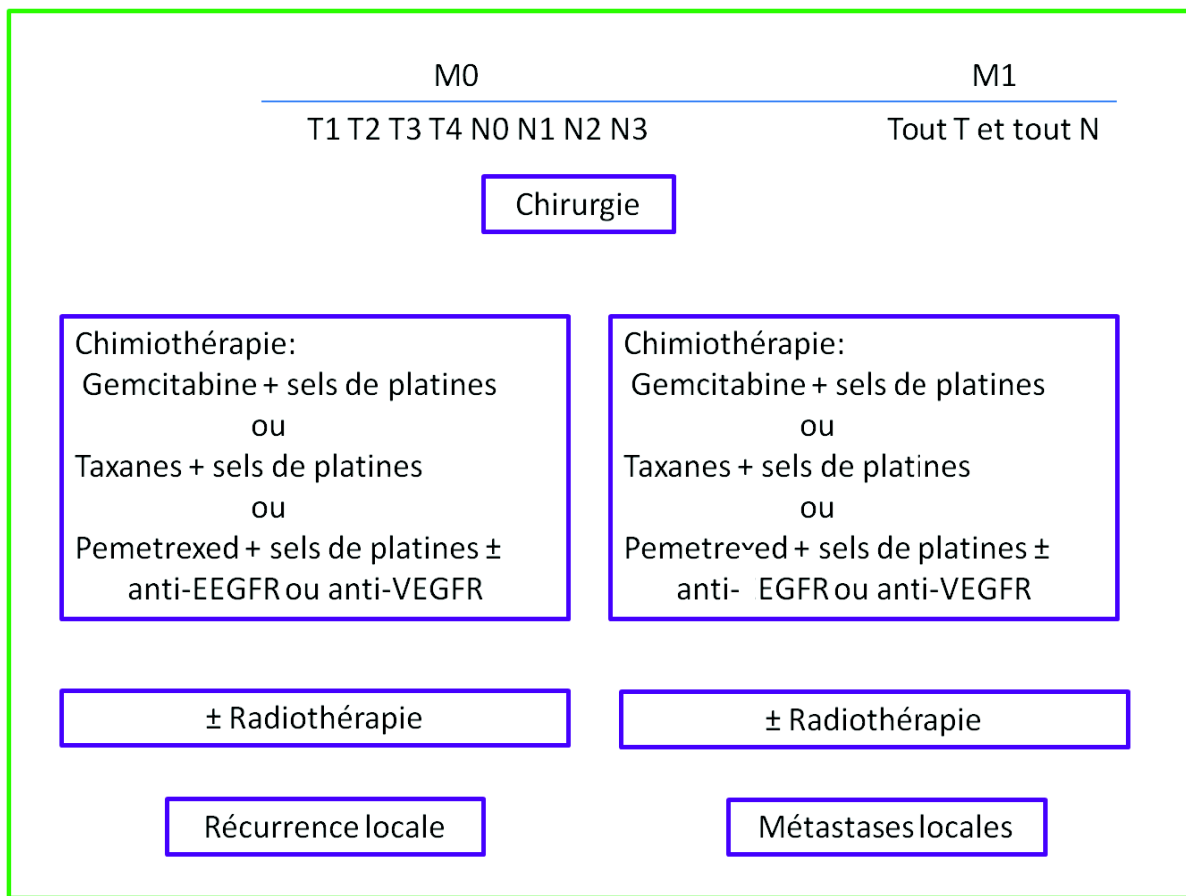


Figure 3. Algorithme de traitement pour les CBNPCs (d'après Zarogoulidis et al., 2013)

Afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de CBNPCs, les démarches thérapeutiques s'orientent de plus en plus vers la recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux différentes thérapies, ainsi que de marqueurs pronostiques. Un parfait exemple de ces biomarqueurs est l'expression des protéines impliquées dans la réparation des lésions causées sur l'ADN, RRM1 et ERCC1, détectée par immunohistochimie, qui aurait à la fois une valeur pronostique et prédictive de la réponse aux traitements. En effet, il a été démontré

que chez les patients atteints de CBnPCs, ceux possédant de hauts niveaux de RRM1 et de ERCC1 seraient ceux ayant une survie plus longue après résection de la tumeur à des stades précoces. On peut penser que l'instabilité génétique chez ces patients serait moins importante du fait de l'augmentation de la capacité de réparation des lésions sur l'ADN. Cependant, ces mêmes patients présentant de hauts niveaux de RRM1 et de ERCC1 présenteraient des résistances aux traitements gemcitabine et cisplatine dans le cadre d'un traitement adjuvant, en raison sans doute d'une augmentation de la capacité des cellules tumorales à réparer les lésions générées au niveau de l'ADN par ces agents génotoxiques (Olaussen et al., 2006). D'autre part, les recherches menées pendant ces dernière décennies ont permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement tumoral, et du rôle que joue le microenvironnement tumoral dans ce processus. Ces découvertes ont permis de définir de cibles moléculaires précises et de créer de nouveaux agents thérapeutiques s'attaquant spécifiquement à ces cibles. Ceci a aussi permis de sélectionner des populations de patients chez qui la probabilité de réponse à ces traitements serait plus élevée. Comme mentionné précédemment, le gefitinib chef de file des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR est aujourd'hui largement utilisé dans le traitement des patients porteurs d'adénocarcinomes et présentant des mutations au niveau de ce récepteur (Ulivi et al., 2013). Les patients non-mutés pour ce récepteur ayant montré une meilleure réponse aux agents chimiothérapeutiques. Une autre stratégie consiste à asphyxier les tumeurs en empêchant la formation du réseau vasculaire qui les nourrit. Les inhibiteurs de la voie VEGF-A/VEGFR ont été créés dans le but de cibler les cellules endothéliales et d'empêcher la formation de cette vasculature alimentant la tumeur. Ces agents ciblent souvent le ligand VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth factor-A*) ou l'activité tyrosine kinase des récepteurs de ce ligand, les VEGFRs (*Vascular Endothelial Growth factor Receptor*). Plusieurs de ces agents sont actuellement approuvés par la FDA (*Federal Drug Administration*) dans le traitement des CBnPCs notamment, en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques. Le bénéfice réel qu'apporte le traitement par ces agents reste encore sujet de controverse et les possibilités de les utiliser dans les traitements adjuvants est encore en cours d'exploration. La présentation spécifique et l'utilisation de ces thérapies anti-angiogéniques feront l'objet d'un chapitre plus détaillé au cours de cette introduction.

PARTIE II : L'angiogenèse

Aussi bien dans les tissus normaux que tumoraux, l'apport en nutriments et en oxygène mais aussi l'élimination du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques sont cruciaux pour la croissance et pour le maintien de l'intégrité de ces tissus. La présence d'un réseau vasculaire assurant ces fonctions d'approvisionnement et de drainage est donc nécessaire. La mise en place d'un tel réseau s'opère via un processus dit d'angiogenèse. Bien que l'angiogenèse ait été à ce jour définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants, il apparaît que les vaisseaux qui soutiennent la croissance tumorale peuvent aussi provenir de précurseurs originaires de la moelle osseuse ou même se différencier à partir de cellules souches tumorales.

II.1. L'angiogenèse : rôle dans la physiologie et le développement

Durant l'embryogenèse, le développement d'une vasculature implique, d'une part, la génération de nouvelles cellules endothéliales à partir de précurseurs cellulaires, les angioblastes, qui sont recrutés et qui se différencient en réponse aux signaux locaux ; et d'autre part, l'arrangement en tube des cellules endothéliales ainsi obtenues; ce processus est connu sous le nom de vasculogenèse. Cette étape, est typiquement suivie par un bourgeonnement de vaisseaux formant un réseau organisé, ceci implique les cellules endothéliales des vaisseaux préexistants, c'est l'étape d'angiogenèse (Figure 4). Une variété de signaux angiogéniques induit l'adoption d'un phénotype activé. Par la suite, des cellules endothéliales, appelées « *Tip cells* » dégradent les jonctions qui les lient aux cellules voisines, bourgeonnent en direction du gradient de facteurs pro-angiogéniques, et guident d'autres cellules adjacentes, appelées « *Stalk cells* », qui prolifèrent pour former un tube. Puis, le recrutement de cellules périvasculaires (péricytes), va assurer la stabilité et la maturité des vaisseaux. Finalement, un remodelage et une réorganisation, vont permettre à ces derniers de former un réseau de veines et d'artères fonctionnel (Carmeliet and Jain, 2011; Eichmann and Simons, 2012).

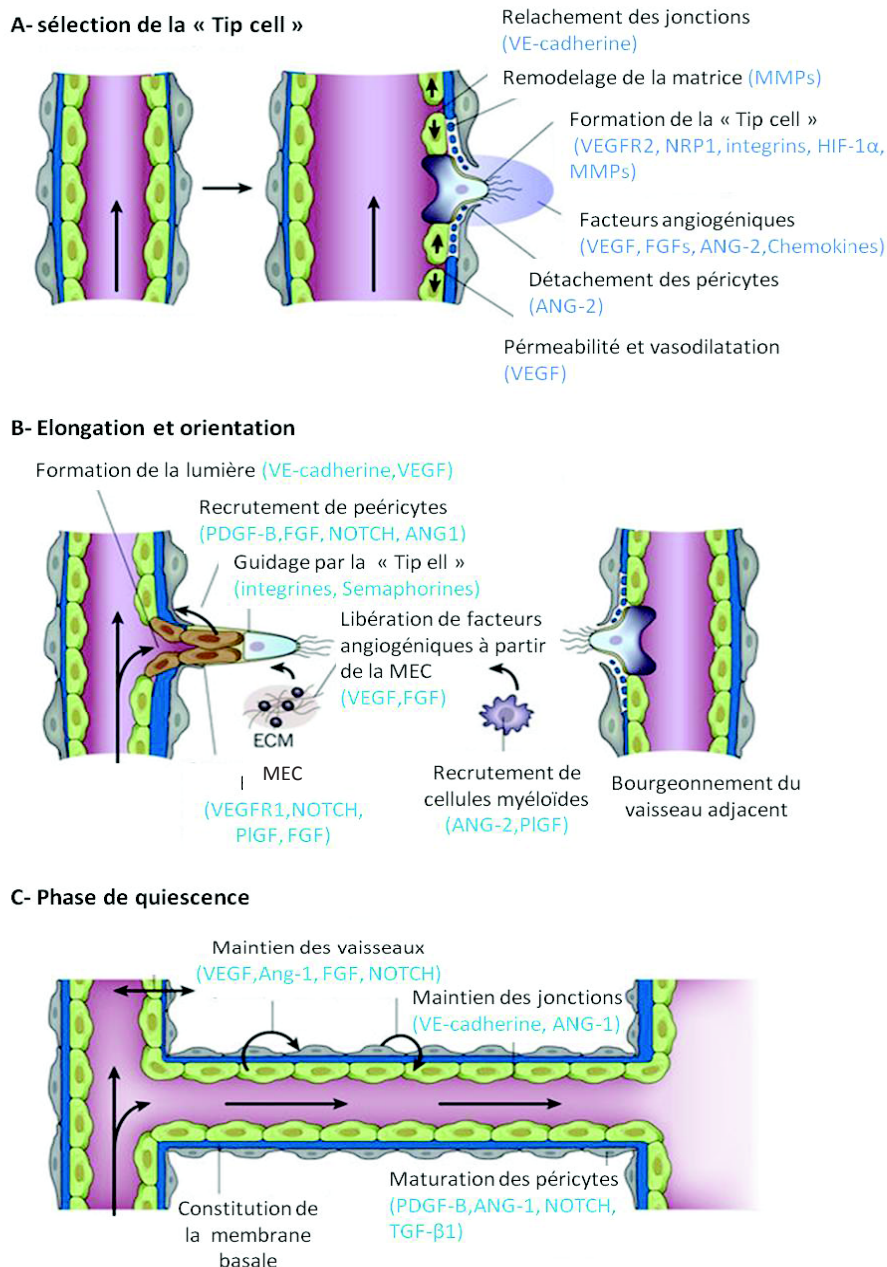


Figure 4. Les étapes de l'angiogenèse physiologique. Les étapes successives de ramification des vaisseaux sanguins sont présentées, avec les principaux acteurs moléculaires impliqués notés entre parenthèses. **A.** Après stimulation par des facteurs angiogéniques, le vaisseau quiescent se dilate et une « Tip Cell » est sélectionnée, cette étape est suivie par une série d'événements favorisant la migration cellulaire. **B.** La « Tip Cell » migre vers le foyer angiogénique en suivant le gradient des facteurs, les « Stalk Cells » prolifèrent, forment une lumière, et permettent l'élongation pour créer un néo-vaisseau, qui va être stabilisé grâce au recrutement de péricytes. **C.** Après fusion des branches voisines, la formation de la lumière permet la perfusion du néo-vaisseau, qui reprend alors son état initial de quiescence. La mise en place d'une matrice extracellulaire et la maturation des péricytes permettent de renforcer la stabilité des vaisseaux (d'après Carmeliet and Jain, 2011).

A l'issue de cette étape de morphogenèse du réseau vasculaire, la vasculature normale devient majoritairement quiescente. En effet, chez l'adulte, l'angiogenèse reste active car les cellules endothéliales conservent la capacité à répondre aux stimuli angiogéniques, mais seulement de manière transitoire. Ainsi, l'angiogenèse est réactivée au cours de la grossesse afin de permettre le développement du placenta, et fait aussi partie de certains processus physiologiques tels que la réparation des lésions tissulaires, la croissance musculaire ou le cycle de reproduction chez la femme (Weis and Cheresh, 2011). Cependant, dans certaines conditions pathologiques comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Kent, 2014) , première cause de cécité chez les personnes âgées, les troubles inflammatoires ou les cancers (Weis and Cheresh, 2011), les mêmes voies de signalisation angiogéniques sont induites et exploitées. A l'inverse, un défaut d'angiogenèse entraînant des troubles ischiémiques est impliqué dans certaines pathologies cardiaques et neuro-dégénératives (Oka et al., 2014; Quaegebeur et al., 2011).

II.2. L'angiogenèse tumorale

La croissance et la progression tumorales, au même titre que toutes les autres structures cellulaires croissantes, nécessitent la présence d'une vasculature suffisamment développée pour garantir l'apport en nutriments. Initialement, l'angiogenèse était décrite comme un processus intervenant lors d'une croissance rapide de tumeurs macroscopique, cependant il apparait à travers des études *in situ* plus récentes, que l'angiogenèse serait aussi un facteur important dans la progression néoplasique des tumeurs à leur stade microscopique. Une fois l'angiogenèse activée, les tumeurs montrent différents modes de néovascularisation. Certaines tumeurs, même les plus agressives comme les adénocarcinomes canauxaires pancréatiques sont hypovascularisés et regorgent de « déserts » de stroma largement avasculaires (Olive et al., 2009). D'autres types tumoraux comme les carcinomes neuroendocriniens rénaux et pancréatiques sont hautement vascularisés (Hanahan and Weinberg, 2011).

Bien qu'un évènement oncogénique puisse permettre aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire et même d'augmenter leur survie, en considérant des facteurs comme : le volume de la lésion tumorale, la privation de nutriments, l'hypoxie et la grande vitesse de prolifération, la tumeur va finalement avoir besoin d'un approvisionnement sanguin afin de continuer à se développer. A ce titre, parmi les propriétés essentielles qui vont transformer

une cellule épithéliale normale en cellule tumorale, on retrouve la capacité des cellules tumorales à induire la néoangiogenèse (Hanahan and Weinberg, 2011). Afin de pouvoir accéder à cet apport sanguin, les cellules tumorales peuvent modifier la balance des facteurs stimulateurs ou inhibiteurs de l'angiogenèse, appelés respectivement pro- ou anti-angiogéniques, afin d'attirer les cellules endothéliales (CEs) vers le microenvironnement tumoral. Cela implique un bourgeonnement continu de néo-vaisseaux à partir d'une vasculature sensée être quiescente à l'état normal. Cette étape est qualifiée de « switch angiogénique ». Ce *switch* est gouverné par plusieurs facteurs compensatoires qui induisent ou répriment l'angiogenèse et dont la balance d'expression va être altérée en faveur des facteurs pro-angiogéniques (Bergers and Benjamin, 2003). Différents signaux peuvent activer le switch angiogénique tels que le stress métabolique, la baisse du pH, l'hypoxie, l'inflammation, la chute de la glycémie et certains oncogènes (Carmeliet and Collen, 1999). Ce switch sera pratiquement activé en permanence dans les états néoplasiques où il contribuera de manière importante au maintien et à la croissance des tissus tumoraux, ainsi qu'à leur dissémination. Ainsi, dans différents types de cancers, la densité de vaisseaux intra-tumoraux est souvent associée à la formation de métastases et à la survie des patients (Bigler et al., 1993; Macchiarini et al., 1992; Wakui et al., 1992).

Les vaisseaux sanguins produits à l'intérieur des tumeurs sont aberrants, car ils se forment suite à une activation chronique de l'angiogenèse. La vasculature tumorale est marquée par un bourgeonnement précoce de capillaires, par des ramifications de vaisseaux excessives et intriquées, par des vaisseaux trop larges et déformés, un flux sanguin erratique, des microhémorragies, des fuites, et une quantité anormale de cellules endothéliales en prolifération et en apoptose. Ces vaisseaux sont aussi largement immatures avec des défauts de membrane basale et de recouvrement par les péricytes (Figure 5). La conséquence de ce réseau de vaisseaux sanguins en continu remodelage est que le flux sanguin au sein de la tumeur est irrégulier. Ainsi, malgré le nombre élevé de néo-vaisseaux qui se développent continuellement, l'apport sanguin reste réduit au niveau de la tumeur, qui reste de ce fait hypoxique (Carmeliet and Jain, 2011).

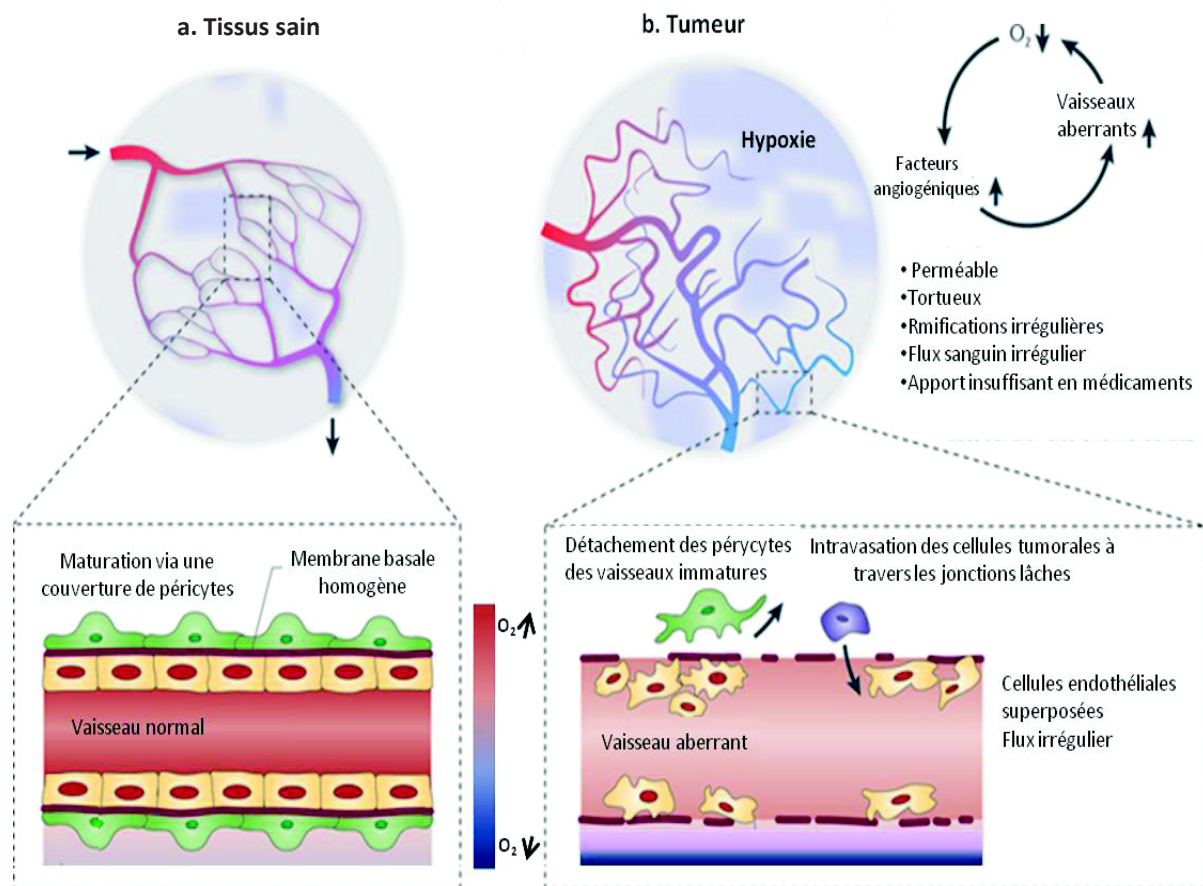


Figure 5. Organisation de la vasculature et structure des vaisseaux dans les états normaux et pathologiques. **a.** Dans un tissu sain, le réseau vasculaire est organisé, les vaisseaux sanguins sont réguliers, possèdent un endothélium normal, une membrane basale homogène et sont entourés par une couche de péricytes matures, ce qui rend ces vaisseaux fonctionnels et le flux sanguin régulier. **b.** Dans les tumeurs, la vasculature présente des défauts structuraux et fonctionnels au niveau de l'endothélium, de la membrane basale aussi bien qu'au niveau de la couche de péricytes censée entourer les vaisseaux matures. La présence de ces défauts de vascularisation aboutit à la formation de zones hypoxiques (représentées par le dégradé bleu sur la figure). Cet état d'hypoxie engendrera à son tour l'apparition de néo-vaisseaux toujours plus instables (*d'après Carmeliet et Jain, 2011*).

L'angiogenèse est un processus complexe qui implique l'altération des structures vasculaires préexistantes et la mobilisation de cellules progénitrices et de cellules dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules constituent une population capables de se diviser et de former de nouveaux vaisseaux sanguins, elles peuvent aussi sécréter plusieurs facteurs pro-angiogéniques qui vont amplifier l'angiogenèse sur le site de la tumeur (Grunewald et al., 2006; Melero-Martin and Dudley, 2011). La production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales sous l'effet du VEGF-A résulte en une vasodilatation. D'autre part, le VEGF-A induit une augmentation de l'expression des métalloprotéases MMPs qui dégradent la matrice

extracellulaire en libérant des agents pro-angiogéniques qui y étaient séquestrés. Ces événements sont suivis par la migration et la prolifération des CEs sous l'effet du VEGF-A et d'autres facteurs pro-angiogéniques (Alevizakos et al., 2013). Au cours du développement tumoral, les cellules cancéreuses sont capables de manipuler leur environnement afin d'amplifier le phénomène d'angiogenèse. La croissance rapide des tumeurs et l'augmentation de leurs besoins métaboliques induit une hypoxie, qui est souvent plus importante au centre de la tumeur. Cette hypoxie induit une expression plus importante du facteur de transcription HIF1 α par les cellules tumorales, les cellules endothéliales (CEs) et les cellules stromales, et de ce fait entraîne la libération de plusieurs agents pro-angiogéniques. Ces facteurs vont attirer des cellules myéloïdes sur le site de la tumeur, où ces cellules vont se différencier en macrophages associés aux tumeurs. Ces macrophages vont permettre de créer un microenvironnement inflammatoire riche en cytokines et en agents pro-angiogéniques que les cellules tumorales vont utiliser pour promouvoir leur propre croissance (Weis and Cheresh, 2011). D'autres cellules dérivées de la moelle osseuse telles que des précurseurs hématopoïétiques, des neutrophiles, des mastocytes ou des monocytes, jouent aussi un rôle au cours de l'angiogenèse tumorale en favorisant la sécrétion de molécules pro-angiogéniques (Qian and Pollard, 2010). Enfin, les fibroblastes du tissu stromal infiltrent aussi les tumeurs et induisent le recrutement de cellules progénitrices endothéliales sécrétant des facteurs pro-angiogéniques (Joyce and Pollard, 2009). Le micro-environnement tumoral amplifie donc le switch angiogénique mais aussi comme nous le verrons plus loin dans cette introduction participe à la résistance des tumeurs aux traitements anti-angiogéniques.

II.3. L'angiogenèse tumorale : perte de l'équilibre fragile entre facteurs pro- et anti-angiogéniques

Un équilibre entre les facteurs activateurs et inhibiteurs permet de réguler le processus angiogénique dans les conditions physiologiques (Carmeliet, 2005; Folkman, 2007). En conditions pathologiques, notamment dans les cancers, cet équilibre est perdu. L'un des inducteurs les plus connus de l'angiogenèse est l'hypoxie. Lorsque le taux d'oxygène est insuffisant dans les tissus, des mécanismes d'adaptation efficaces sont mis en place pour rétablir l'apport en oxygène. Parmi ces mécanismes, on retrouve la stimulation de l'angiogenèse et la reprogrammation du métabolisme de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse anaérobie (Semenza, 1998). Ces changements adaptatifs sont principalement

orchestrés au niveau moléculaire par les protéines HIF-1 et HIF-2 (*Hypoxia Inducible Factor*). Les facteurs de transcription HIF sont des facteurs hétérodimériques composés de 2 sous-unités, la sous-unité α qui est régulée par l'hypoxie, et la sous-unité β qui est constitutive. Le facteur HIF-1 α est le membre le plus étudié de la famille des facteurs de transcription HIF et joue un rôle central dans la réponse à l'hypoxie (Semenza, 1998). Comme HIF-1 α ne détecte pas directement les variations de l'oxygène, la présence de capteurs d'oxygène est nécessaire. Ces capteurs sont notamment représentés par des enzymes de la famille proline-hydroxylases telles que PHD2 et FIH, dont l'activité est régulée par l'oxygène. L'expression de HIF-1 α est induite lorsque le pourcentage d'oxygène est inférieur à 6%. En normoxie, les capteurs d'oxygène maintiennent des niveaux bas de HIF-1 α en l'hydroxylant et en permettant de ce fait sa poly-ubiquitinylation par la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) et sa dégradation par le protéasome (Appelhoff et al., 2004). Lorsque le taux d'oxygène diminue dans les tissus, ces répresseurs de HIF-1 α ne peuvent plus exercer leur fonction. La protéine HIF-1 α va alors s'accumuler et pouvoir se fixer sur ses séquences consensus HREs (*Hypoxia-Response Elements*) présentes sur les promoteurs de ses gènes cibles et activer leur transcription (Semenza, 1998). La stabilisation de HIF-1 α induit la production d'une variété de médiateurs angiogéniques tels que le VEGF-A, un médiateur crucial du processus angiogénique, le PlGF (*Placental Growth Factor*), le PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*), le VEGFR1, le VEGFR2, l'angiopoïétine-2 et les MMPs (*Matrix metalloproteinases*) (Kelly et al., 2003) (Figure 6). D'autres facteurs pro-angiogéniques s'accumulent aussi au cours du développement tumoral, tels que le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), le premier facteur pro-angiogénique qui a été découvert (Gospodarowicz and Thakral, 1978). FGF2 stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que contribue à la dégradation de la matrice extracellulaire. Pour contrebalancer les effets des facteurs pro-angiogéniques, des facteurs anti-angiogéniques sont aussi exprimés et permettent de réguler le processus d'angiogenèse. Les représentants les plus importants de cette catégorie sont l'endostatine, l'angiostatine, la thrombospondine-1 (TSP1) (Kalluri, 2003) et l'angiopoïétine (Folkman, 2007). Les protéines TSP1, angiostatine et endostatine (figure 6) inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et sont capables d'inhiber la croissance tumorale de carcinomes pulmonaires (Folkman, 2007; Tsuchida et al., 2013).

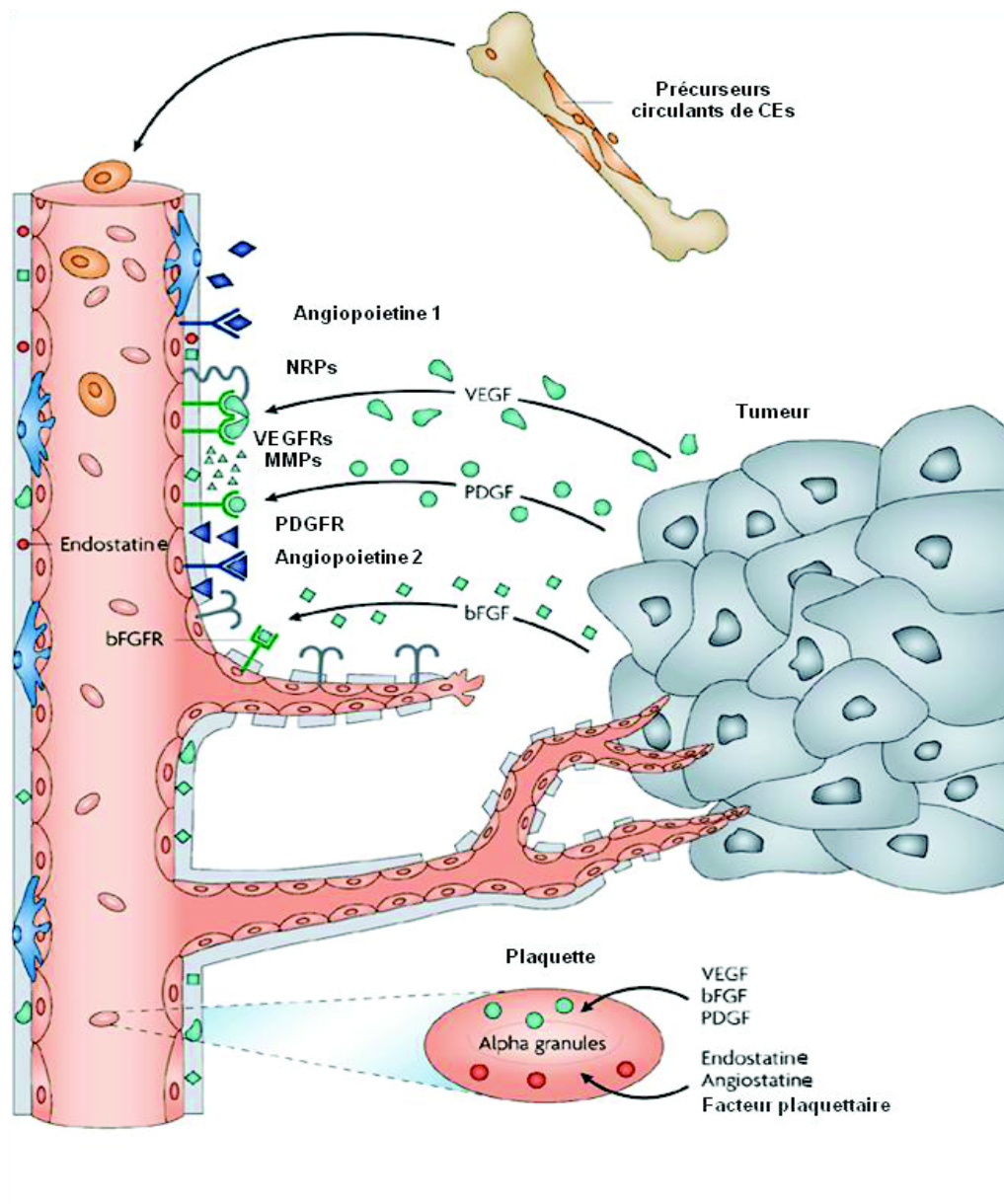


Figure 6. Régulateurs endogènes de l'angiogenèse tumorale. L'angiopoïétine 1, est exprimée par de nombreuses cellules et se lie au récepteur TIE-2 au niveau de l'endothélium. Elle aide à maintenir un état normalisé dans les vaisseaux sanguins. Le VEGF est sécrété par les cellules tumorales et se lie à son récepteur VEGFR2 et à ses co-récepteurs les neuropilines (NRPs) sur les cellules endothéliales. Il constitue la fraction majoritaire des protéines pro-angiogéniques sécrétées par les tumeurs. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont libérées par les cellules tumorales, mais aussi par les cellules endothéliales stimulées par le VEGF. Les MMPs peuvent libérer les protéines pro-angiogéniques du stroma, mais peuvent également cliver l'endostatine à partir du collagène IV/III présent au niveau de la paroi des vaisseaux et participer au clivage de l'angiostatine à partir du plasminogène circulant. L'angiopoïétine 2 sécrétée par les tumeurs entre en compétition avec l'angiopoïétine 1 pour la liaison au récepteur TIE-2 et augmente la dégradation de la membrane basale vasculaire et la migration des cellules endothéliales. Le PDGF sécrété par les tumeurs peut réguler à la hausse son propre récepteur le PDGFR dans les CEs. Le bFGF sécrété par les tumeurs joue aussi une fonction pro-angiogénique. Les intégrines des CEs transmettent des signaux dans les deux directions et permettent la liaison à la Matrice Extra Cellulaire (MEC), une exigence pour les cellules afin de maintenir la viabilité et la réactivité aux protéines régulatrices de la croissance. Les CEs font partie des cellules les plus dépendantes de l'ancrage à la matrice extra-cellulaire. Certaines protéines régulatrices de l'angiogenèse sont stockées par les plaquettes, puis libérées dans le système vasculaire de la tumeur (*d'après Judah, 2007*).

II.4. La famille des VEGF

Malgré l'implication à ce jour de plus d'une cinquantaine de facteurs de croissance différents au cours du processus d'angiogenèse, le VEGF et ses récepteurs, les VEGFRs, sont considérés comme des éléments moléculaires essentiels à ce processus au sein des facteurs activateurs (Bergers and Benjamin, 2003). C'est pour cette raison, qu'aussi bien les ligands que les récepteurs ont été envisagés comme des cibles thérapeutiques privilégiées. Les VEGFs sont des régulateurs clé du développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques dans les états physiologiques comme pathologiques. Aujourd'hui, les membres de la famille des VEGFs sont au nombre de cinq facteurs structuralement rapprochés : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF (figure 7). La complexité de cette famille est d'autant plus accrue, par épissage alternatif (VEGF-A, VEGF-B et PlGF), que par des modifications post-traductionnelles (VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D) (Ferrara, 2010; Koch et al., 2011). Ces VEGFs exercent différentes fonctions biologiques en se liant avec une haute affinité à trois récepteurs à activité tyrosine kinase, les VEGFR1, 2 et 3 (Eichmann and Simons, 2012). VEGF-A se lie sur les récepteurs VEGFR-2 (aussi nommé KDR/Flk-1) et VEGFR-1 (Flt-1). VEGF-C et VEGF-D se lient sur les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 (Flt4). PlGF et VEGF-B se lient uniquement sur le récepteur VEGFR-1 (figure 6).

Le VEGF-A et les autres membres VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF et le VEGF-Fs viral appartiennent à la sous-famille des PDGF (*platelet-derived growth factor*) et à la superfamille des facteurs à domaine « cystine-knot ». Tous les membres de cette superfamille se caractérisent par la présence de huit résidus cystéine conservés formant la structure typique « cystine-knot » (deux cystéines liées par liaison S-S). Le groupe des VEGFs est lié dans l'évolution avec d'autres groupes de facteurs de la superfamille à domaine « cystine-knot » dont les hormones glycoprotéiques, la famille des protéines « *mucin-like* » et la famille des protéines TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) (Holmes and Zachary, 2005). Les protéines VEGF sont retrouvées dans toutes les espèces de vertébrés et sont très conservées au cours de l'évolution. Elles jouent un rôle central dans la régulation de nombreux processus biologiques comme : la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

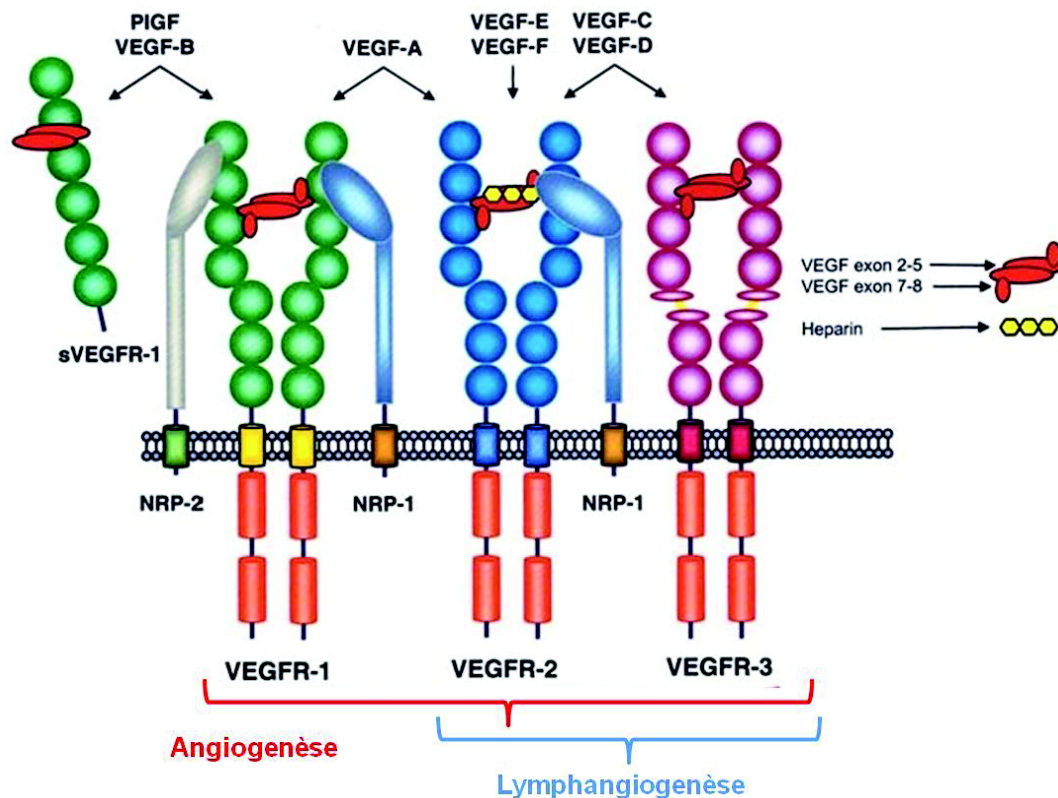


Figure 7. Membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs. Les interactions des ligands VEGF avec leurs récepteurs et potentiellement avec les corécepteurs neuropilines (NRP1/NRP2) induisent l'activation de plusieurs voies de signalisation aboutissant soit à l'angiogenèse soit à la lymphangiogenèse selon le type de ligand et de récepteur impliqués (*d'après Cébe Suarez et al., 2006*).

Les VEGF-C et VEGF-D possèdent une forte affinité pour VEGFR-3 (Figure 7) . Ils jouent un rôle central dans la lymphangiogenèse en favorisant la croissance et la migration des cellules endothéliales lymphatiques qui expriment ce récepteur (Berggreen and Wiig, 2014). Le VEGF-C, mais pas VEGF-D (Baldwin et al., 2005), est exprimé au cours de l'embryogenèse et il a été démontré que les souris knock-out pour le VEGF-C (VEGF-C^{-/-}) présentent un phénotype létal au stade prénatal en raison de l'accumulation de liquide dans les tissus lié à un défaut de lymphangiogenèse (Karkkainen et al., 2004). Les VEGF-C et VEGF-D peuvent subir un clivage protéolytique qui permet la fixation des formes clivées au VEGFR-2 et l'activation de l'angiogenèse (Baldwin et al., 2005). Les VEGF-C et VEGF-D apparaissent également capables de se fixer au corécepteur neuropiline-2 pour stimuler l'angiogenèse (Kärpänen et al., 2006). Ces fonctions pourraient en partie expliquer le rôle du

VEGF-C et du VEGF-D en tant que marqueurs pronostiques dans les cancers mammaires (Wang et al., 2012). Ces études suggèrent donc des liens entre angiogenèse et lymphangiogenèse.

Le VEGF-B a été découvert en 1996 et décrit alors comme un homologue du VEGF-A. La séquence d'acides aminés du domaine d'homologie du VEGF-B est à 47% similaire à celle du VEGF₁₆₅ et à 37% similaire à celle du PlGF (Li and Eriksson, 2001). Le VEGF-B est abondamment exprimé dans la plupart des tissus et organes. Un épissage alternatif donne naissance à deux isoformes VEGF-B₁₆₇ et le VEGF-B₁₈₆ respectivement d'un poids moléculaire de 42 kDa et de 60 kDa. Le VEGF-B₁₆₇ a un domaine de liaison à l'héparine en C-terminal qui lui permet suite à sa sécrétion de se lier aux HSPGs (*Heparan Sulfate Protéoglycans*) présents à la surface des cellules. L'isoforme VEGF-B₁₈₆ quand à elle ne possède pas ce domaine et est de ce fait diffusible. De la même manière que le VEGF-A, le VEGF-B se lie au VEGFR1 et à la neuropiline-1, mais ne se lie pas au VEGFR-2. A cause de sa grande homologie avec le VEGF-A, on a soupçonné au départ une activité pro-angiogénique du VEGF-B. Cependant, les résultats des études sur son pouvoir angiogénique restent controversés (Li et al., 2012). Aucune fonction biologique n'a été formellement identifiée pour le VEGF-B dans des conditions normales. Des études ont montré que la délétion du gène *VEGF-B* chez la souris n'avait pas de conséquences biologiques particulières. Contrairement au VEGF-A et au VEGF-C dont la délétion est létale pour l'embryon de la souris, les souris *VEGF-B* ^{-/-} ont une durée de vie normale pendant laquelle elles sont en bonne santé (Aase et al., 2001). Cette délétion du *VEGF-B* n'affecte ni l'angiogenèse, ni le remodelage des vaisseaux dans les conditions pathologiques (Li et al., 2008; Louzier et al., 2003). En fait, certaines études lui ont attribué un rôle de facteur de survie pour les cellules endothéliales, les péricytes et les muscles lisses (Zhang et al., 2009), suggérant son rôle dans le maintien de la stabilité vasculaire.

Le VEGF-A est essentiel pour la formation des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse précoce. Son importance au cours du développement physiologique est attestée par le fait qu'une diminution de 50% de son expression soit létale au stade embryonnaire (Eichmann and Simons, 2012). En effet, non seulement les souris ayant un knock-out homozygote du *VEGF-A*, mais aussi des souris hétérozygotes (*VEGF-A*^{+/-})

présentent un phénotype embryonnaire létal dû à la formation de vaisseaux sanguins immatures. Ces résultats indiquent que le taux local de VEGF-A dans des embryons doit être étroitement régulé pour aboutir à l'angiogenèse (Carmeliet et al., 1996; Ferrara, 2000) . Quelques semaines après la naissance, l'expression du VEGF-A diminue dans la plupart des tissus et reste faible dans les organes adultes, excepté le plexus choroïde cérébral, les alvéoles pulmonaires, les glomérules rénaux ou le cœur. Son expression est augmentée durant certains processus physiologiques (cicatrisation) et pathologiques. Il est sécrété par divers types cellulaires, tels que les cellules vasculaires au niveau de l'aorte, les kératinocytes, ou les macrophages (Holmes and Zachary, 2005). Malgré la complexité du processus d'angiogenèse tumorale et le nombre grandissant de facteurs impliqués, il apparaît que le VEGF-A est un régulateur crucial de ce processus. D'ailleurs son expression, tant sur le plan de son ARNm ou de sa protéine, augmente dans la plupart des tumeurs (Ferrara, 2004). De plus, une augmentation de ses taux plasmatiques est détectée chez les patients atteints de cancer (Botelho et al., 2010; Rogoziński et al., 2012). De façon intéressante, une méta-analyse récente réalisée sur une série de 1816 patients porteurs de CBnPCs, carcinomes colorectaux ou rénaux a montré une association entre de hauts niveaux de VEGF-A circulants et une diminution de la survie sans progression et de la survie globale en réponse au bevacizumab (Hegde et al., 2013). Même si de telles corrélations ne sont pas retrouvées dans tous les types tumoraux, il apparaît donc que de hauts niveaux plasmatiques de VEGF-A soient un marqueur de progression tumorale et donc de mauvais pronostic. Dans cette étude, il est aussi très intéressant de noter que les auteurs n'ont pas retrouvé de corrélation entre les niveaux plasmatiques mesurés par ELISA et les niveaux intra-tumoraux détectés par immunohistochimie, ce qui pourrait expliquer certaines contradictions décrites entre différentes études concernant la présence/absence de corrélation entre expression de VEGF-A et pronostic.

II.5. La voie de signalisation dépendante du VEGF-A : ligands et récepteurs

Dans la carcinogenèse, tout aussi bien que dans n'importe quel contexte physiologique ou pathologique, le rôle principal du VEGF-A consiste donc en la promotion de l'angiogenèse. Les actions du VEGF-A (Figure 8) sur les CEs sont régulées par l'hypoxie , l'inflammation, la production de radicaux libres oxygénés (Alevizakos et al., 2013), mais aussi par sa liaison aux constituants de la MEC et l'action de certains mécanismes protéolytiques (Ferrara, 2010).

Dans le cadre de la promotion des cancers pulmonaires, tout comme pour les autres types de tumeurs, ses principaux effets consistent en l'induction de la prolifération, de la survie, de la migration de CEs et le recrutement des progéniteurs endothéliaux. Cependant, comme nous le verrons par la suite, de plus en plus de données indiquent que le VEGF-A exerce aussi une fonction autocrine sur les cellules tumorales qui expriment à leur surface les récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et/ou leurs corécepteurs NRP1 et NRP2 (Alevizakos et al., 2013; Goel and Mercurio, 2013). Si on a longtemps pensé que cette boucle autocrine était une boucle conditionnant la survie et la prolifération des cellules tumorales, des données récentes suggèrent que le rôle du VEGF-A dans ce contexte est plus compliqué qu'initialement envisagé. A côté de son effet sur les cellules tumorales, le VEGF-A agit aussi sur d'autres types cellulaires. Il exerce un effet neuro-protecteur sur différentes cellules du système nerveux (Oosthuyse et al., 2001). Il intervient aussi au cours du métabolisme osseux (Zelzer et al., 2004). Sur la base de l'ensemble de ses fonctions, on comprend donc que la régulation de l'expression du VEGF-A est primordiale à l'état physiologique car son expression anarchique conduit au développement de pathologies.

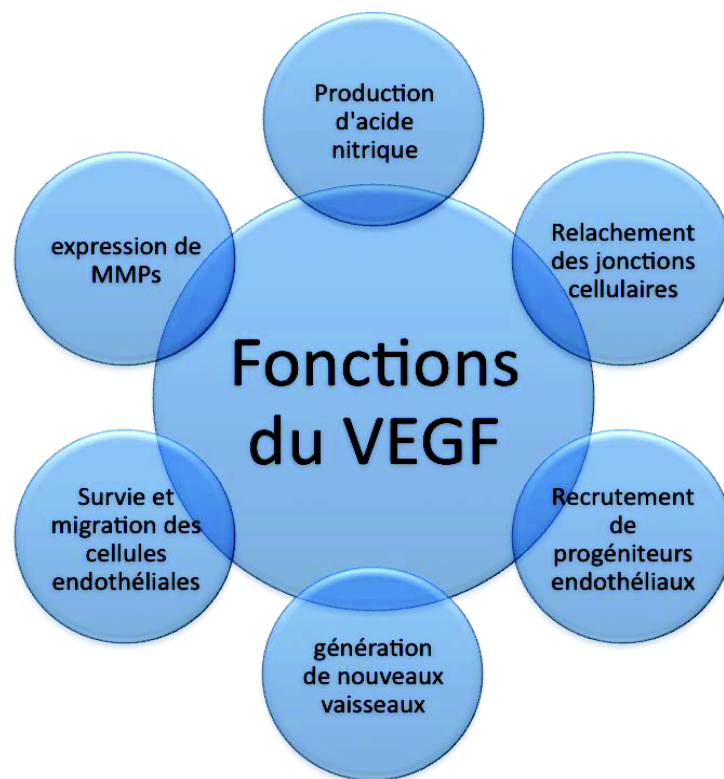


Figure 8. Effets induits par le VEGF-A durant l'angiogenèse (D'après Alevizakos et Kaltsas, 2013).

II.5.1. *VEGF-A* : un gène hautement régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel

Le génome humain est composé d'environ 25000 gènes. Relativement, cela représente un nombre très faible de gènes si on le compare à des organismes moins complexes comme *Drosophila melanogaster* (13601 gènes). Cette observation a permis de mettre à jour les différents mécanismes qui aboutissent à la diversité du protéome chez l'Homme. En utilisant différents modes de régulation de l'expression des gènes, modifications transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles, les cellules peuvent produire environ 100000 protéines différentes. Parmi les gènes dont l'expression est étroitement régulée à différents niveaux, le *VEGF-A* est régulé à toutes les étapes concevables de l'expression des gènes (Arcondéguy et al., 2013). Il est ainsi régulé : (1) au niveau transcriptionnel, mais aussi (2) au niveau post-transcriptionnel via un contrôle de l'épissage alternatif de son ARM pré-messager et la génération de différents variants d'épissage présentant des fonctions biologiques distinctes en ce qui concerne la localisation sub-cellulaire et l'activité des isoformes protéiques codées par ces variants d'épissage, (3) au niveau de la stabilité de son ARNm et (4) au niveau de la traduction de son ARNm (Arcondéguy et al., 2013).

II.5.1.1. Régulation transcriptionnelle du *VEGF-A*

Le gène *VEGF-A* humain est situé sur le chromosome 6 à 6p21.3 (Vincenti et al., 1996). Il comprend huit exons et sept introns et s'étend sur environ 14 kb (Tischer et al., 1991) (figure 9). La séquence promotrice du gène *VEGF-A* représente 1,2 kb chez la souris et le rat (Shima et al., 1996), alors qu'une région de 2,36 kb est critique dans le gène humain (Buteau-Lozano et al., 2002). Ce promoteur est dépourvu d'une séquence consensus pour une boîte TATA, mais il contient plusieurs sites consensus de liaison pour des régulateurs transcriptionnels, y compris AP1, AP2 et SP1, des régulateurs dépendants de facteurs de croissance, de cytokines, d'hormones et de l'activation de gènes oncogènes et suppresseurs de tumeur (Pagès and Pouyssegur, 2005). Ainsi, le niveau d'oxygène a un rôle clé dans le contrôle de l'expression du *VEGF-A* (Shweiki et al., 1992) via la stabilisation, en conditions hypoxiques, des facteurs de transcription de la famille HIF principalement HIF1 α et HIF2 α qui régulent les niveaux de *VEGF-A* en se fixant au HRE présent au niveau gène *VEGF-A* (Minchenko et al., 1994). Les niveaux d'ARNm du *VEGF-A* peuvent aussi être augmentée par certains facteurs de

croissance dont les protéines TGF- α , TGF- β , IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*), FGF et PDGF. Il a été suggéré que la sécrétion paracrine ou autocrine de ces facteurs pourrait coopérer avec un état d'hypoxie locale pour réguler l'expression du VEGF-A (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Neufeld et al., 1999). Dans certaines conditions d'inflammation, certaines cytokines comme IL1- α (interleukin-1 α) et IL-6 induisent l'expression du VEGF-A dans différents types cellulaires. Des mutations oncogéniques, telles que des mutations de Ras, ou l'amplification de Myc peuvent aussi conduire à l'augmentation de l'expression de VEGF-A (Okada et al., 1998). Il faut aussi préciser qu'il existe un autre promoteur dans la région 5'-UTR du *VEGF-A*, situé 633 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription principal. L'insensibilité de cet autre promoteur à l'hypoxie indique l'absence de co-régulations avec la région promotrice principale et la possibilité d'une régulation dans des conditions distinctes (Akiri et al., 1998).

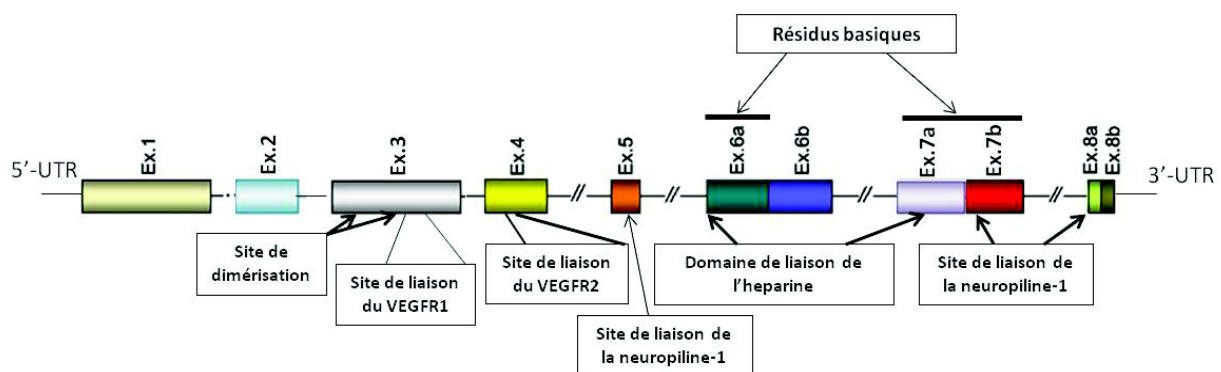


Figure 9. Représentation schématiques des domaines fonctionnels encodés par les différents exons du gène du VEGF-A. les résidus basiques qui confèrent une affinité pour les protéoglycanes contenant de l'héparine sont indiquées. Parce que VEGF_{165b} ne lie pas l'héparine, il a été proposé que l'exon 8b pourrait exercer un effet négatif sur la liaison à l'héparine. A l'inverse, l'exon 8a serait nécessaire pour la liaison à l'héparine. Exons 3 et 4 encodent les domaines de liaison aux VEGFR1 et VEGFR2. Les séquences des exons 5, 7, 8a sont nécessaires pour la liaison du VEGF-A aux neuropilines. En conséquence, les isoformes VEGF_{xxx}b ne se lient pas neuropilines (d'après Nowak et al., 2008).

II.5.1.2. Régulations post-transcriptionnelles du *VEGF-A*

Parallèlement à la régulation transcriptionnelle, qui ne concerne qu'une fraction du VEGF-A exprimé, le *VEGF-A* est hautement régulé par des modifications post-transcriptionnelles qui occupent une place primordiale dans la régulation de ce facteur. Parmi ces modifications, on trouve des régulations au niveau de la queue polyA ou des régulations au niveau de la traduction de l'ARNm *VEGF-A* grâce à la présence côté 5'-UTR de 2 séquences IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) et de 3 codons start alternatifs CUG permettant une initiation de la traduction différente (Arcondéguy et al., 2013). De façon intéressante, dans les tumeurs pulmonaires, il a été montré que le VEGF-A lui-même était capable de réguler sa propre traduction via une boucle autocrine de rétrocontrôle mettant en jeu une activation de la voie mTOR dépendante du récepteur VEGFR2 (Chatterjee et al., 2013). De plus, la stabilité de l'ARNm *VEGF-A* est hautement contrôlée. En effet, en conditions normales d'oxygène et de nutriments, la demi-vie de l'ARNm du VEGF-A est de 15-40 min « *in vitro* » (Dibbens et al., 1999; Shima et al., 1995). La stabilité de l'ARNm *VEGF-A* est principalement régulée par des séquences présentes au niveau de son extrémité 3'-UTR, que sont les séquences ARE (*AU-Rich Element*). En conditions normoxiques, ces séquences sont la cible de protéines telles que AUF1 ou la tristetraproline (TTP) qui vont déstabiliser l'ARNm *VEGF-A* via le recrutement de la machinerie de dégradation des ARNs (Zhang et al., 2002). A l'inverse, en conditions hypoxiques, ces mêmes séquences contribuent à la stabilisation de l'ARNm VEGF-A en permettant la liaison de protéines telles que HuR, hnRNPL, PAIP2 (*Poly(A)-Binding Interacting Protein 2*) ou encore l'oncoprotéine MDM2 (Arcondéguy et al., 2013). Enfin, le *VEGF-A* est hautement régulé par épissage alternatif de son ARN pré-messager qui génère comme nous allons le voir des isoformes protéiques possédant des propriétés bien distinctes.

II.5.2. Les différents variants d'épissage du VEGF-A : structure et fonction

Chez les eucaryotes, l'épissage alternatif des pré-ARNm constitue un processus clé de contrôle de l'expression des gènes puisque l'on estime à l'heure actuelle que plus de 90% des gènes possédant plusieurs exons sont régulés par épissage alternatif (Pan et al., 2008; Sultan et al., 2008). Il est de plus en plus admis que ce processus participe aux processus physiologiques et pathologiques tels que le développement des cancers (Germann et al., 2012). Au cours de l'épissage alternatif, les exons mais aussi des introns peuvent être soit

conservés dans la séquence d'ARN messenger mature, soit excisés suivant différentes combinaisons pour créer un large éventail d'ARNm à partir d'un seul pré-ARNm. En outre, l'épissage alternatif au niveau des régions non codantes des ARNm peut conduire à la suppression de certains éléments de régulation tels que des activateurs de la traduction ou certains domaines nécessaires à la stabilité de l'ARN, et affecter de manière significative le niveau d'expression de la protéine. Les événements d'épissage alternatifs qui altèrent la région de l'ARNm codant pour la protéine vont quant à eux générer des protéines qui diffèrent par leur séquence d'acides aminés et donc par leurs activités (Arcondéguy et al., 2013).

II.5.2.1. Les différents variants d'épissage VEGF_{xxx} du VEGF-A : structure et biodistribution

Comme mentionné précédemment, le gène du *VEGF-A* comprend 8 exons et 7 introns. L'existence de différents variants d'épissage du VEGF-A résultant de l'épissage alternatif de son pré-ARNm a été décrite deux ans après sa découverte (Houck et al., 1992; Tischer et al., 1991). A ce jour, chez l'homme, neuf variants d'épissage du VEGF-A, dénommés VEGF_{xxx} où le xxx représente le nombre total d'acides aminés présents dans la protéine mature après le peptide signal ont été décrits. Ils comprennent les isoformes VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ (Figure 10) (Arcondéguy et al., 2013; Ferrara, 2004). Chez la Souris, les isoformes VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ et VEGF₁₈₈ sont, respectivement, les homologues murins du VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉ décrits chez l'humain. L'une des caractéristiques typiques de la structure des isoformes du VEGF-A consiste en la présence en position N-terminale d'une séquence de 26 acides aminés hydrophobes codée par l'exon 1. Cette séquence est retrouvée dans la majorité des protéines sécrétées. Tous les variants d'épissage du VEGF-A décrits jusqu'alors, sauf l'isoforme VEGF₁₁₁, possèdent les cinq premiers exons. La génération des différentes isoformes du VEGF-A résulte alors de l'inclusion et/ou exclusion des exons 6a, 6b ou 7. Ainsi, le VEGF₁₈₉ ne possède pas les résidus codés par l'exon 6b, le VEGF₁₆₅ ceux codés par l'exon 6 et le VEGF₁₂₁ ceux codés par les exons 6 et 7. Les exons 6a et 7 codent pour des séquences hautement conservées riches en résidus basiques et qui possèdent une affinité pour l'héparine. La présence ou l'absence de ces résidus va donc conférer une biodisponibilité différente aux isoformes du VEGF-A (Vempati et al., 2011). Le VEGF₁₂₁ est une protéine acide qui ne lie pas l'héparine et est très diffusible, alors que les VEGF 206, 189, 183, 162 et 145 sont très

souvent liés aux héparines présents à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire : ils sont très peu diffusibles (Houck et al., 1992). L'isoforme VEGF₁₆₅ a une biodistribution intermédiaire avec 50-70% de liaison à la matrice extracellulaire. Les isoformes du VEGF-A retenues à la matrice extracellulaire constituent un réservoir à partir duquel elles peuvent être rapidement libérées en réponse aux héparinases, héparane sulfate ou aux enzymes protéolytiques telles que la plasmine ou l'UPA (*Urokinase-type Plasminogen Activator*) (Houck et al., 1992; Plouët et al., 1997) . L'épissage alternatif du *VEGF-A* contribue donc à la formation d'un gradient de VEGF-A essentiel au processus de néovascularisation tumorale.

Les isoformes les plus diffusibles agissant au niveau des sites distaux pour promouvoir le recrutement vasculaire, alors que celles associées à la membrane cellulaire et à la matrice extracellulaire agissent en favorisant l'expansion locale des capillaires (Grunstein et al., 2000). De façon intéressante, le VEGF₁₈₉ peut aussi se retrouver dans le noyau car il possède une région très riche en résidus très basiques qui pourrait correspondre à un signal de localisation nucléaire (Lejbkiewicz et al, 2005). A l'heure actuelle, on ne connaît pas le rôle de cette localisation nucléaire de VEGF₁₈₉.

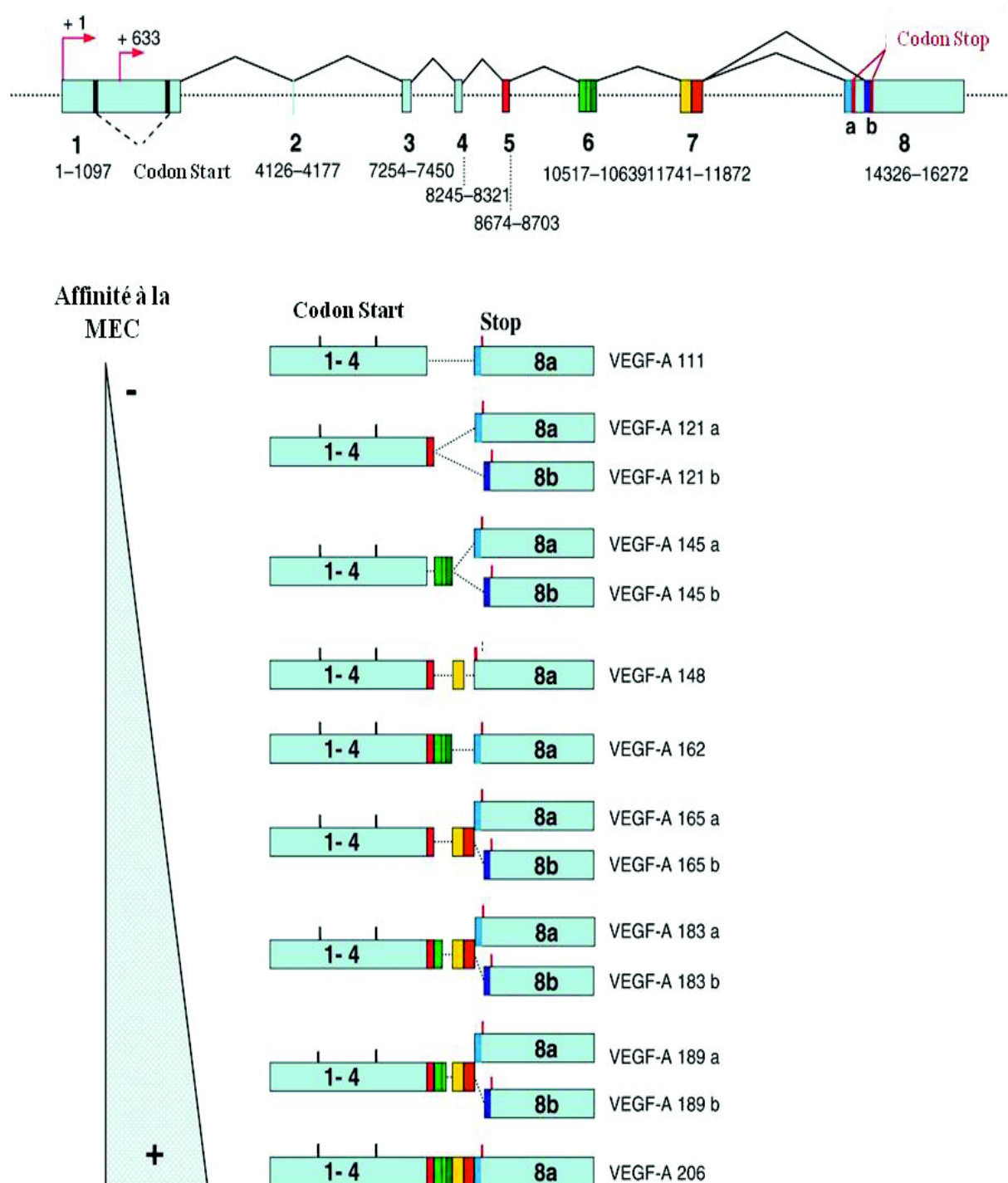


Figure 10. Structure du gène du *VEGF-A* humain et exons composant les différents isoformes. Toutes les isoformes du VEGF-A décrites jusqu'à aujourd'hui, et nommées selon le nombre d'acides aminés compris dans leur séquence peptidique, contiennent les parties encodées par les exons 1 à 5, à l'exception de l'isoforme VEGF₁₁₁, et peuvent aussi intégrer différentes séquences pour l'exon 8. La sélection du site d'épissage distal ou proximal au niveau de l'exon terminal résulte en deux familles d'isoformes : la famille pro-angiogénique VEGF_{xxx} et la famille anti-angiogénique VEGF_{xxx}b. Les exons 6 et 7 codent le domaine de liaison à l'héparine, qui conditionne la capacité de diffusion des différentes isoformes et leur affinité avec la matrice extracellulaire (MEC) (d'après Arcodénguy et al., 2013).

II.5.2.2. Les différents variants d'épissage VEGF_{xxx} du VEGF-A : fonctions biologiques

Afin de démontrer clairement le rôle crucial de l'épissage alternatif dans la régulation de l'activité du VEGF-A, différentes souris transgéniques n'exprimant qu'une seule isoforme du VEGF-A ont été générées. Ces études ont permis de montrer que durant le développement embryonnaire et dans les tissus adultes, le rapport entre les différentes isoformes varie de façon spatio-temporelle (Ng et al., 2001). Si les souris hétérozygotes VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ et VEGF₁₈₈ sont en bonne santé (Carmeliet and Collen, 1999; Stalmans et al., 2002), les embryons de souris n'exprimant que le VEGF₁₂₀ à l'état homozygote présentent des altérations de l'angiogenèse cardiaque au stade postnatal entraînant une grave ischémie du myocarde, une mort précoce et un développement vasculaire pulmonaire altéré. Dans ces expériences, la moitié des embryons meurt durant la période périnatale à cause de malformations congénitales et l'autre moitié succombe dans les 2 semaines après la naissance, en raison notamment d'une ischémie myocardique (Mattot et al., 2002). De la même façon, la moitié des souris exprimant l'isoforme VEGF₁₈₈ décède entre le stade embryonnaire E9.5 et E13.5 (Stalmans et al., 2002). A l'inverse, les souris homozygotes VEGF₁₆₄ sont en bonne santé, fertiles et ont un développement rétinien normal, alors que l'inactivation spécifique de cette isoforme entraîne une létalité au stade embryonnaire avec des défauts de vascularisation majeurs dans tous les organes (Carmeliet and Collen, 1999). Prises ensemble, ces données indiquent que les différentes isoformes du VEGF-A issues de l'épissage alternatif sont nécessaires pour le développement normal de la vasculature, mais que l'isoforme VEGF₁₆₄ est absolument indispensable et ne peut être compensé par les autres isoformes tout du moins au cours du développement chez la souris. Chez l'Homme, l'importance du VEGF₁₆₅ a été décrite durant l'implantation de l'embryon, le cycle menstruel chez la femme, la réparation tissulaire ou la cicatrisation (Ferrara, 2004; Sung et al., 2010). A côté de ses fonctions angiogéniques, l'isoforme VEGF₁₆₅ joue aussi un rôle dans la croissance et la survie de cellules non endothéliales, incluant les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques (Katoh et al., 1995), les neurones et les cellules de Schwann (Lambrechts et al., 2003; Sondell et al., 1999), les cellules épithéliales rénales (Villegas et al., 2005) ou les podocytes (Foster et al., 2005).

II.5.2.3. Profil d'expression des isoformes VEGF_{xxx}

Sur la base des études effectuées jusqu'alors, principalement par analyse des transcrits par RT-PCR ou RT-QPCR dans un large panel de lignées cellulaires, tissus et tumeurs, la plupart des tissus produit préférentiellement les ARNm codant pour les VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉, l'ARNm VEGF₁₆₅ étant majoritaire. L'ARNm VEGF₁₂₁ est abondant dans le poumon et le rein. L'ARNm VEGF₁₈₉ est exprimé dans les tissus cardiaque et vasculaire (Zygalaki et al., 2008). A l'inverse, les ARNm codant pour les VEGF₁₄₅ et VEGF₂₀₆ sont rarement exprimés et plutôt restreints au placenta (Cheung et al., 1995). Le VEGF₁₁₁ a été découvert en 2007 dans différentes lignées tumorales traitées par des agents génotoxiques (Mineur et al., 2007). Malgré toutes ces études démontrant les profils d'expression différentiels des différents VEGF_{xxx}, on connaît très peu de choses sur les mécanismes moléculaires contrôlant cet épissage. Certains facteurs d'épissage tels que SAM68 (Cohen et al., 2005), la protéine CAPER (Dowhan et al., 2005) ont été décrits comme régulant l'épissage VEGF_{xxx}, et une séquence régulatrice ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) a été identifiée dans l'exon 6b (Wang et al., 2009). On ne sait pas ce que lie cette séquence. Dans l'utérus, la progestérone augmente l'expression du VEGF₁₈₉ (Ancelin et al., 2002), et dans les cellules de l'endomètre, l'acidification favorise l'ARNm VEGF₁₂₁ par un mécanisme mettant en jeu la p38 MAPK et les facteurs d'épissage SRSF1, SRSF5 et SRSF3 (Elias and Dias, 2008).

Les isoformes VEGF_{xxx} ont démontré des propriétés pro-tumorigéniques dans plusieurs types tumoraux notamment dans les CBnPCs. En accord avec des fonctions distinctes de ces différentes isoformes, il a été montré que les cellules murines de fibrosarcomes exprimant un seul des isoformes VEGF_{xxx} donnent lieu à des tumeurs possédant des profils vasculaires distincts (Tozer et al., 2008). Chez l'Homme, l'analyse des différents variants d'épissage, par RT-PCR ou RT-QPCR, a montré que les transcrits les plus abondants dans les tumeurs pulmonaires et coliques étaient ceux du VEGF₁₆₅ et du VEGF₁₂₁ (Zygalaki et al., 2007). Dans les cancers pulmonaires, une augmentation du transcrit VEGF₁₂₁ a été associée à un mauvais pronostic et à un envahissement ganglionnaire (Kawai et al., 2008). L'expression de l'ARNm VEGF₁₆₅ a été corrélée à la progression, l'invasion, une diminution de la survie cellulaire et à un mauvais pronostic dans différentes tumeurs (Inoue et al., 1997; Kaya et al., 2000; Lee et al., 1999; Maeda et al., 1996). Les niveaux de transcrits du VEGF₁₈₉ ont été décrits comme un

facteur pronostique dans les CBnPCs (Matsuyama et al., 2009). Cet isoforme serait aussi nécessaire à la croissance de xénogreffes de CBnPCs *in vivo*, les tumeurs qui surexpriment cet isoforme étant plus volumineuses et mieux perfusées que celles surexprimant le VEGF₁₂₁ et le VEGF₁₆₅ (Yuan et al., 2011). De façon intéressante, une étude récente a compilée toutes les données connues concernant l'expression des différents transcrits VEGF_{xxx} dans les tissus sains et tumoraux (Vempati et al., 2011). Cette étude confirme l'existence de profils d'expression différents des VEGF_{xxx} selon le tissu et le type tumoral considérés. Ces résultats démontrent donc que l'épissage du *VEGF-A* est un acteur important du processus de tumorigenèse. Cependant, aucune étude n'a jusqu'alors analysé l'expression des différents variants VEGF_{xxx} au niveau protéique, tout du moins à large échelle. Ceci est lié au fait qu'il n'existe pas d'anticorps permettant de détecter spécifiquement l'une ou l'autre des isoformes disponible sur le marché. La question qui se pose et qui demeure sans réponse est donc de savoir si l'expression des ARNm reflète bien l'expression des isoformes au niveau protéique.

II.5.3. La famille des variants VEGF_{xxx}b : un nouvel acteur encore controversé

II.5.3.1. Les variants VEGF_{xxx}b : structure

Comme le montre la Figure 11, l'exon 8 du VEGF-A contient un site d'épissage alternatif en 3' qui peut être utilisé par la cellule pour générer une famille distincte d'isoformes du VEGF-A ayant une longueur identique à celle des isoformes précédemment décrites, mais qui diffèrent au niveau de leur séquence d'acides aminés C-terminaux (Bates et al., 2002). Ces isoformes, dénommées VEGF_{xxx}b, sont générées suite à l'utilisation d'un site d'épissage distal (DSS, *Distal Splice Site*), situé 66 nucléotides en aval du site d'épissage proximal (PSS, *Proximal Splice Site*). Cela résulte en l'excision de l'exon 8a et produit un ARNm codant pour des isoformes qui ont 94-98% d'homologie avec les isoformes VEGF_{xxx} mais qui diffèrent uniquement au niveau de leurs 6 derniers acides aminés (Bates et al., 2002). Les isoformes VEGF_{xxx} possèdent une extrémité C-terminale Cys -Asp- Lys- Pro -Arg- Arg (CDKPRR) et les isoformes VEGF_{xxx}b, une extrémité C-terminale Ser -Leu- Thr- Arg -Lys- Asp (SLTRKD) (Ladomery et al., 2007). Cette différence en C-terminal modifie la structure tertiaire de la protéine (Woolard et al., 2009). Ainsi, le résidu Cys- 160 qui forme une liaison disulfure avec le résidu Cys- 146 dans l'exon 7 dans le cas des isoformes VEGF_{xxx}, se trouve remplacé par

un résidu acide (Asp) dans les isoformes VEGF_{xxx}b. D'autre part, dans les isoformes VEGF_{xxx}b, les deux arginines hautement chargées présentes en C-terminal des isoformes VEGF_{xxx} sont remplacées par un résidu lysine à charge neutre et un résidu acide aspartique. La substitution d'une proline par une arginine contribue également à une modification profonde de la relation structure-fonction de ces isoformes, notamment leur capacité à lier les neuropilines. De plus, l'isoforme VEGF₁₆₅b n'est pas capable de lier l'héparine, malgré la présence de l'exon 7, suggérant une implication directe de l'exon 8a ou une fonction inhibitrice de l'exon 8b dans cette interaction (Delcombel et al., 2013). Ainsi, en comparaison des isoformes VEGF_{xxx}, les isoformes VEGF_{xxx}b ont une biodisponibilité et une activité différentes. Comme nous le verrons plus en détail par la suite, les isoformes VEGF_{xxx}b sont en effet des isoformes ayant une activité anti-angiogénique sur les cellules endothéliales capables d'antagoniser les fonctions des isoformes VEGF_{xxx}.

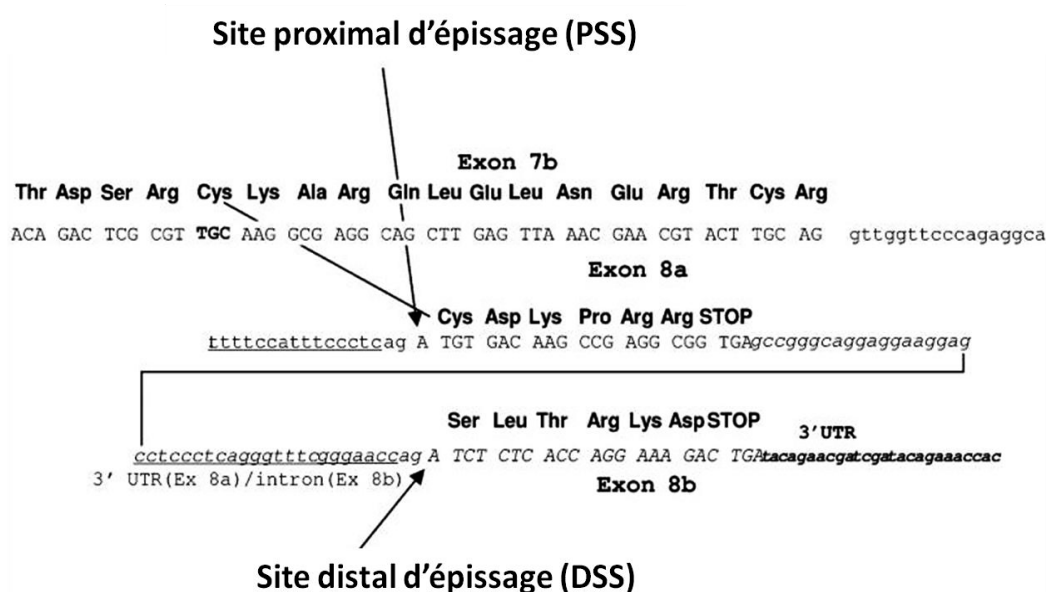


Figure 11. La structure de la séquence d'acides aminés de l'extrémité 3' des isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b. VEGF_{xxx}b diffère de VEGF_{xxx} par seulement six acides aminés au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. La sélection du site d'épissage proximal (PSS) produit une protéine pro-angiogénique possédant la séquence (CDKPRR) en C-terminal, tandis que la sélection du site d'épissage distal (DSS) génère une protéine anti-angiogénique avec une séquence unique (SLTRKD) en C-terminal. Par conséquent, le VEGF_{xxx}b ne possède ni liaison disulfure entre Cys-146 et Cys160, ni un point d'inflexion de la proline, ce qui produit un changement dans la structure tertiaire. Les majuscules représentent les ORFs (Opening Reading Frame). Les minuscules représentent des introns ou séquences 3'UTR. (D'après Woolard et al., 2009).

II.5.3.2. Les variants VEGF_{xxx}b : profil d'expression et régulation

Le VEGF₁₆₅b a été le premier isoforme VEGF_{xxx}b identifié par Bates et ses collaborateurs (Bates et al., 2002). Des études ultérieures ont ensuite démontré l'existence des VEGF₁₂₁b, VEGF₁₈₃b, VEGF₁₄₅b (Perrin et al., 2005) et du VEGF₁₈₉b (Miller-Kasprzak and Jagodziński, 2008). Sur la base d'analyses de RT-PCR, RT-QPCR, western-blot, ou ELISA, il a été estimé que les isoformes VEGF_{xxx}b représentent plus de 50% de la quantité de VEGF-A total dans les tissus normaux, non angiogéniques tels que le poumon (82%), le colon (>95%), la peau (>95%) (Qiu et al., 2009) et la vitrée (66%) (Perrin et al., 2005). A l'inverse, les isoformes VEGF_{xxx}b représenteraient une petite fraction du VEGF-A total dans le placenta (1,4%) (Bates et al., 2006).

Aujourd'hui encore, on en sait peu sur les événements cellulaires et moléculaires qui régulent l'épissage alternatif et qui conduisent à la génération des deux familles d'isoformes distincts VEGF_{xxx} ou VEGF_{xxx}b. En 2008, l'équipe de Bates a montré dans les cellules primaires épithéliales que l'IGF-1 et le TNF- α favorisaient le choix du site proximal d'épissage et donc les isoformes VEGF_{xxx}, alors que le TGF- β 1 favorisait le site distal, donc les isoformes VEGF_{xxx}b (Nowak et al., 2008) (Figure 12). Par la suite, cette équipe a identifié les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR (*Serine/Arginine Rich protein*) comme des régulateurs de cet épissage. Dans ce contexte, les protéines SRSF1 (SF2/ASF) et SRSF5 (SRp40) favorisent la sélection du site d'épissage proximal, alors que SRSF6 (SRp55) favorise l'utilisation du site distal (Harper and Bates, 2008). Les voies de signalisation mises en jeu ont aussi été caractérisées. Ainsi, l'action du TGF- β 1 nécessite la voie p38MAPK et CLK/STY, alors que IGF-1 active les voies PKC et SRPK1/2 (Figure 12). Le rôle de la voie du TGF- β 1 et de SRSF6 dans la régulation de l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b a aussi été décrit dans les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales de patients atteints de sclérose systémique (Manetti et al., 2011).

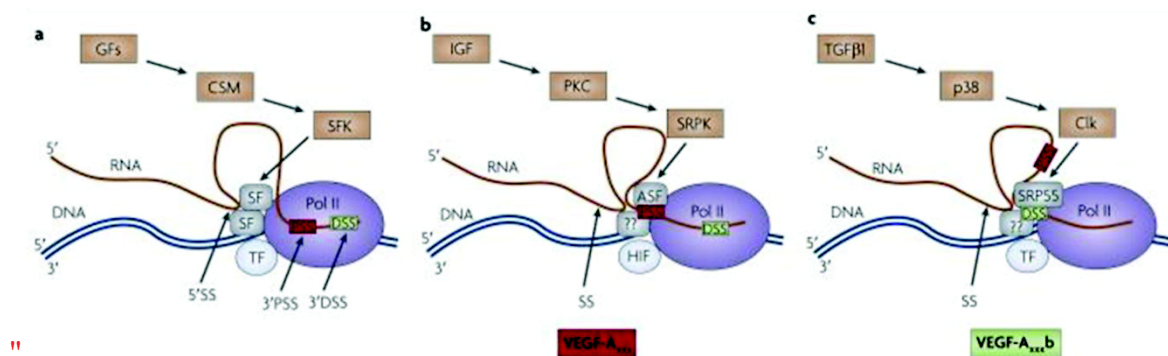


Figure 12. Régulation de l'épissage alternatif du VEGF. **a.** Le domaine CTD de l'ARN polymérase II (Pol II) recrute des facteurs de transcription (TF) et des facteurs d'épissage (SF). Les SF sont recrutés par la machinerie transcriptionnelle en raison de leur interaction avec Pol II, ils reconnaissent des séquences en cis sur les pré-ARNm et les deux sites d'épissage (SS), donneur en 5' (5'SS) ou accepteurs en 3', peuvent être reconnus. Les facteurs d'épissage (SF) recrutés sont dépendants de la séquence ESE, ils peuvent être régulés par des kinases (SFK), qui sont elles même régulées par des molécules de signalisation cellulaire (CSM) en aval des facteurs de croissance (GFs). **b.** La régulation de la sélection PSS du VEGF-A par l'IGF. L'IGF active la protéine kinase C (PKC) et induit la phosphorylation de SRPKs. Ces dernières activent le facteur d'épissage SRSF1 et favorisent la sélection du PSS. **c.** Les facteurs influant sur le choix de DSS du VEGF. Le TGFβ1 conduit à l'activation de la p38MAPK et à l'activation subséquente des kinases CLK1 et CLK4. CLK1 et CLK4 phosphorylent le facteur d'épissage SRSF6, résultant en la sélection du DSS et la production de VEGF_{xxx}b. Il est également possible que SRSF1 soit inactivée par CLK1 et CLK4, ou que la phosphorylation des SF puisse changer leur position, leur dégradation ou leur l'affinité de liaison (d'après Harper and Bates, 2008)).

Dans les tumeurs, nous avons aussi décrit l'implication des protéines SR dans le contrôle des isoformes VEGF_{xxx}b. Ainsi, dans des lignées cellulaires dérivées de CBnPCs, nous avons montré que le facteur de transcription E2F1 favorise l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b par un mécanisme impliquant l'expression du facteur d'épissage SRSF2 (Merdzhanova et al, 2010). Dans les tumeurs de Wilms, la mutation du gène suppresseur de tumeur WT1 augmente l'expression de la kinase SRPK1 (Serine/arginine-Rich Protein Kinase 1) qui phosphoryle le facteur SRSF1, promouvant de ce fait sa localisation nucléaire et induisant l'expression des isoformes pro-angiogéniques VEGF_{xxx} (Amin et al., 2011). De façon intéressante, nous avons montré que le cisplatine contrôle l'expression de SRSF2 dans les CBnPCs (Edmond et al., 2011). Peu de données existent en ce qui concerne l'effet des chimiothérapies sur la production de VEGF-A dans les tumeurs. Néanmoins, dans les cellules de carcinomes colorectaux, une étude a montré que les chimiothérapies augmentaient significativement le taux de transcrits du VEGF-A (Fan et al., 2008). On ignore encore aujourd'hui si ces agents ont un effet sur la production des différentes isoformes du VEGF-A. Ainsi, malgré le grand nombre d'études portant sur l'expression et la fonction des différentes

isoformes du VEGF-A, notre compréhension des mécanismes de régulation de l'épissage alternatif en est encore à ses débuts.

II.5.3.3. Les variants VEGF_{xxx}b : fonctions biologiques

Sur le plan biologique, la plupart des études ont jusqu'alors porté sur le rôle de l'isoforme VEGF₁₆₅b, qui tout comme l'isoforme VEGF₁₆₅, apparaît être celle qui est la plus exprimée à l'intérieur de la sous-famille xxxb. Des tests « *in vitro* » de prolifération et de migration de cellules endothéliales, des tests « *ex vivo* » de mesure de résistance sur vaisseaux isolés, et des expériences « *in vivo* » dans des modèles de xénogreffes dérivées de tumeurs ont permis de montrer que le VEGF₁₆₅b agit comme un dominant négatif qui compète avec et inhibe les effets du VEGF₁₆₅ sur la prolifération, la migration et la vasodilatation des cellules endothéliales (Bates et al., 2002; Cébe Suarez et al., 2006; Qiu et al., 2008; Rennel et al., 2008; Woolard et al., 2004). Il est aussi considéré comme un agoniste partiel des récepteurs de part sa capacité à se fixer à ses récepteurs mais à n'induire qu'une activation incomplète de ces derniers (Cébe Suarez et al., 2006). Il prévient aussi l'angiogenèse oculaire induite par l'hypoxie (Konopatskaya et al., 2006). D'autres fonctions ont été attribuées à cet isoforme. Il exerce notamment des fonctions neuroprotectrices (Qiang et al., 2012), mais est aussi exprimé dans les cellules stromales entourant des tumeurs colorectales (Tayama et al., 2011). Dans les tumeurs, sa surexpression inhibe la croissance de xénogreffes implantées en sous-cutané chez la souris et dérivées de carcinome de la prostate, de sarcome d'Ewing ou de carcinome rénal (Rennel et al., 2008; Woolard et al., 2004). Par ailleurs, l'administration du ligand recombinant VEGF₁₆₅b inhibe la croissance de xénogreffes dérivées de carcinomes coliques en bloquant l'angiogenèse (Rennel et al., 2008). Le VEGF₁₆₅b possède une affinité similaire pour l'anticorps anti-VEGF, bevacizumab (BVZ), indiquant que le ratio des isoformes anti-angiogéniques et pro-angiogénique peut réguler les taux de croissance de la tumeur, mais pourrait aussi affecter la sensibilité des tumeurs au BVZ par compétition (Varey et al., 2008). Finalement, l'isoforme VEGF₁₂₁b elle aussi est capable d'inhiber la migration des cellules endothéliales et la croissance de xénogreffes en prévenant l'angiogenèse (Rennel et al., 2008). En accord avec ces données d'un rôle anti-angiogénique des isoformes VEGF_{xxx}b, leur expression dans certaines tumeurs humaines est diminuée, contrairement à celle des isoformes VEGF_{xxx}. Cela inclut les mélanomes (Pritchard-Jones et al., 2007), les carcinomes prostatiques (Woolard et al., 2004), coliques (Varey et al., 2008), rénaux (Bates et al., 2002),

ou les tumeurs de Wilms (Amin et al., 2011). Dans les carcinomes coliques, la diminution du VEGF_{165b} est associée aux stades avancés, l'invasion vasculaire et l'envahissement ganglionnaire (Díaz et al., 2008). Dans les mélanomes, l'absence de VEGF_{xxx}b prédit le potentiel métastatique (Pritchard-Jones et al., 2007). Dans les neuroblastomes, l'expression du VEGF_{165b} est diminuée en comparaison du VEGF₁₆₅, et l'administration du ligand rhVEGF_{165b} réduit là encore la croissance de xénogreffes dérivées de neuroblastomes (Peiris-Pagès et al., 2010). Dans un modèle de xénogreffes dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires, nous avons montré que l'accumulation de VEGF_{165b} en réponse à l'expression de E2F1 et SRSF2 inhibe la néo-angiogenèse et la croissance tumorale (Merdzhanova et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un switch entre l'expression des isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b en faveur des isoformes VEGF_{xxx}b au cours du développement tumoral.

II.5.3.4. Les variants VEGF_{xxx}b : un rôle et une existence encore controversée

Malgré les nombreuses études démontrant une fonction anti-angiogénique des isoformes VEGF_{xxx}b et détectant ces isoformes dans différents tissus, la réalité de leur existence tout du moins chez la souris ainsi que leur réelle fonction anti-angiogénique demeurent controversées. Cette controverse est en partie liée au fait que la plupart des études publiées sur les VEGF_{xxx}b proviennent de l'équipe qui a découvert ces isoformes. Chez les rongeurs, seules 3 études ont décrit l'expression de ces isoformes (Artac et al., 2009; Ergorul et al., 2008; Zhao et al., 2011). En 2012, Harris et ses collaborateurs ont remis en question l'existence des isoformes VEGF_{xxx}b chez la souris mais aussi chez l'Homme. En effet, les auteurs n'ont pas réussi à distinguer spécifiquement par RT-PCR ou RT-QPCR les variants d'épissage des 2 sous-familles VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b ni détecté la protéine par immunoblot (Harris et al., 2012). Comme discuté plus tard par Bates (Bates et al., 2013), ces différences pourraient être liées à des différences techniques, mais aussi à des différences dans la préparation/conservation des échantillons. Parallèlement à l'étude de Harris, une autre étude publiée par Catena et ses collaborateurs a remis en question la réelle activité anti-angiogénique des isoformes VEGF_{165b} et VEGF_{121b} (Catena et al., 2010). Les auteurs ont montré que des ligands recombinants VEGF_{121b} et VEGF_{165b} stimulent la prolifération des cellules endothéliales et la phosphorylation du récepteur VEGFR2 « *in vitro* » et aussi stimulent l'angiogenèse « *in vivo* ». Cependant, ces effets étant moins marqués que ceux observés avec le VEGF₁₆₅, les

auteurs ont conclu que les variants VEGF₁₆₅b et VEGF₁₂₁b sont moins angiogéniques que le variant VEGF₁₆₅ (Catena et al., 2010). Dans cette même étude, les auteurs ont aussi montré que les niveaux de VEGF_{xxx}b n'étaient pas diminués dans les cancers du sein, mais au contraire augmentés voir plus élevés dans les tumeurs infiltrantes canalaire. Ces résultats indiquent que l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b n'est pas toujours diminuée dans les tumeurs humaines, comme aussi décrit dans les carcinomes rénaux à cellules claires (Grepin et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggère l'existence de fonctions des isoformes VEGF_{xxx}b plus complexes que celles imaginées jusqu'alors et qui pourraient dépendre du type tumoral ou de la balance d'expression des différents variants VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b.

II.5.4. Les récepteurs et corécepteurs du VEGF-A

II.5.4.1. Les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2

Les VEGFRs VEGFR1(FLT-1) et VEGFR2 (KDR/FLK-1) sont des récepteurs structuralement très proches de la famille PDGFR/Fms/Kit/FLT3, récepteurs du PDGF, avec cinq domaines Ig dans la région extracellulaire (Figure 13). Les membres de la famille PDGFR possèdent aussi un domaine tyrosine kinase, cependant, la signalisation dépendante des VEGFRs est assez différente de celle du PDGFR. En effet, les récepteurs de la famille PDGFR/Fms/Kit/FLT3 possèdent un ou plusieurs motifs Y-X-X-M dans la séquence de l'insert de kinase. Après autophosphorylation de cette tyrosine, ce motif va lier le domaine SH2 de la sous-unité SH2 de la PI3K, ce qui va considérablement activer les voies PI3K/AKT et RAS et ainsi induire la prolifération (Shibuya, 2013). A l'inverse, le motif Y-X-X-M n'existe pas dans les domaines kinase des VEGFRs, de ce fait la voie PI3K n'est généralement pas hautement activée après liaison des VEGFs à leurs récepteurs (Shibuya, 2006).

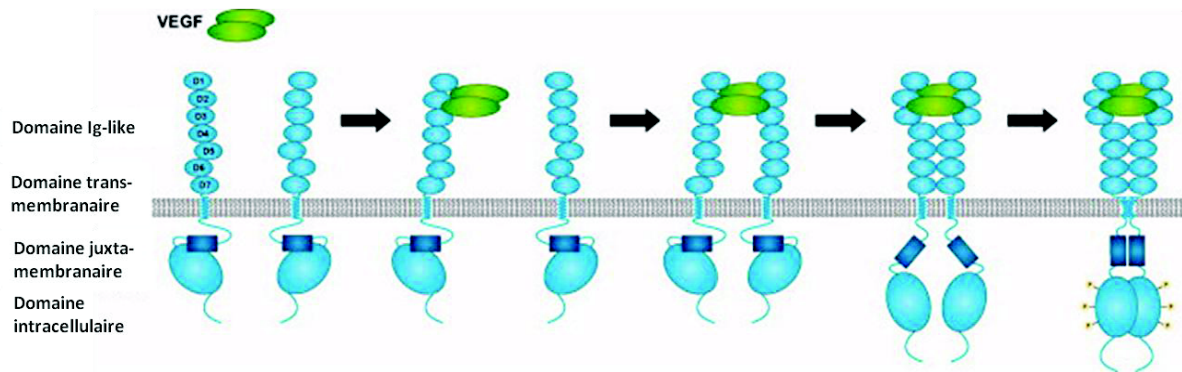


Figure 13. Représentation schématique de la structure du mécanisme d'activation du VEGFR. Un dimère de VEGF lié de manière covalente (vert) se lie au VEGFR (bleu clair et foncé) conduisant à la dimérisation de deux monomères du récepteur. Des interactions supplémentaires entre les domaines de type Ig 4 et 7, les domaines transmembranaires et les domaines juxtamembranaires (bleu foncé) stabilisent le complexe VEGF/VEGFR résultant en une activation du domaine intracellulaire et l'autophosphorylation des résidus tyrosine requis pour la signalisation en aval (d'après Stüttfeld et Ballmer-Hofer, 2009).

Le domaine extracellulaire des VEGFRs consiste en plusieurs sous-unités Ig-like et les segments de liaison les reliant. Trois fonctions distinctes ont été attribuées à ces sous-unités Ig-like : (1) elles forment un domaine de liaison des ligands, (2) elles jouent des rôles auxiliaires dans la dimérisation des récepteurs suite à la liaison des ligands (3) elles maintiennent le récepteur à l'état monomérique en l'absence de ligand (Figure 13) (Stüttfeld and Ballmer-Hofer, 2009). Dans la plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase, deux domaines Ig-like forment le site critique de liaison du ligand. Dans ce contexte, il semble que la sous unité 2 soit nécessaire pour la liaison du VEGF au VEGFR1, alors que la liaison au VEGFR2 nécessite les deux sous-unités 2 et 3 (Christinger et al., 2004; Fuh et al., 1998). Suite à liaison du ligand, les récepteurs forment des dimères qui sont stabilisés par des interactions homotypiques entre les domaines membranaires Ig-like proximaux 4 et/ou 5, comme il a été démontré pour le PDGFR- β et kit. Pour le VEGFR-2, dont le domaine extracellulaire comprend sept domaines Ig-like, le domaine Ig-like 7 est celui impliqué dans les interactions homotypiques. Ces liaisons servent à stabiliser la liaison du ligand au dimère de récepteurs. En absence de ligand, des forces répulsives exercées par les domaines Ig-like 7 et 4 du VEGFR2 assurent une faible activité basale du récepteur. Ainsi, si le maintien des dimères de VEGFRs est assuré par une interaction ligand/récepteur de haute affinité, il apparaît que ces dimères sont par la suite stabilisés par des liaisons homotypiques des monomères au niveau de leurs domaines extracellulaires comme il a été montré pour le PDGFR- β (Yang et al., 2008). Le maintien d'une conformation rigide que permettent les

interactions du ligand avec le dimère de récepteurs renforcé par les liaisons homotypiques va permettre de positionner correctement le domaine kinase intracellulaire du dimère de récepteur actif. De ce fait, les changements structuraux qui se produisent dans le domaine extracellulaire se transmettent au domaine kinase intracellulaire pour promouvoir la signalisation transmembranaire. Cette signalisation se traduit par la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine spécifiques localisés dans le domaine intracellulaire juxtamembranaire, le domaine kinase et l'extrémité C-terminale du récepteur. De ce fait une variété de molécules est recrutée vers le dimère de VEGFR, créant un large complexe moléculaire appelé signalosome capable d'activer en aval la cascade de transduction du signal. Les interactions entre les VEGFRs et les effecteurs d'aval sont établies de façon prédominante au travers des domaines SH-2 (Sec Homology-2) et des domaines de liaison de la phosphotyrosine (PTB). Il semblerait que la dimérisation des VEGFRs soit nécessaire à leur activation, cependant elle ne serait pas suffisante. Afin que le dimère de récepteur soit actif, une orientation appropriée des deux domaines tyrosine kinase est nécessaire. Il a été démontré que le domaine juxtamembranaire intracellulaire joue un rôle important dans l'activation ou la répression de la phosphorylation des VEGFR 1 et 2 (Stuttfield and Ballmer-Hofer, 2009).

Il est à noter que des formes solubles des récepteurs sVEGFR1 et sVEGFR2 sont également exprimées par les cellules. Ces formes résultent soit d'un épissage alternatif, ils possèdent le domaine extra-cellulaire de liaison au ligand VEGF mais sont dépourvues du domaine d'activité kinase et sont donc incapables de signaler (Albuquerque et al., 2009; Yamaguchi et al., 2002). Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire pour séquestrer le VEGF-A et l'empêcher d'exercer ses effets biologiques (Kajdaniuk et al., 2011). Elles agissent donc comme des récepteurs leurres. De façon, intéressante, des résultats d'essais cliniques récents ont montré que de hauts niveaux plasmatiques de sVEGFR1 chez les patients atteints de cancers du sein et du rectum pourraient constituer un marqueur prédictif de réponse à certaines thérapies anti-angiogéniques, telles que le BVZ (Lambrechts et al., 2013).

II.5.4.2. Les corécepteurs neuropilines 1 et 2

Il existe deux membres de la famille des neuropilines (NRPs) qui sont conservés chez les vertébrés, la neuropiline 1 (NRP1) et la neuropiline 2 (NRP2), qui possèdent 44% d'homologie au niveau de leur séquence d'acide aminés. Les membres de la famille des neuropilines sont des protéines transmembranaires de classe I possédant au niveau de leur extrémité N-terminale deux domaines CUB (a1a2) ayant une homologie avec les protéines du complément Cls/Clr. Les neuropilines sont aussi dotées de deux domaines de liaison b1b2 homologues aux domaines C1/C2 des facteurs de coagulation V/VIII, et d'un domaine Meprine/A5-antigen/ptp-Mu (MAM) ou domaine c qui serait impliqué dans la dimérisation du récepteur (Prud'homme et Glinka, 2012).

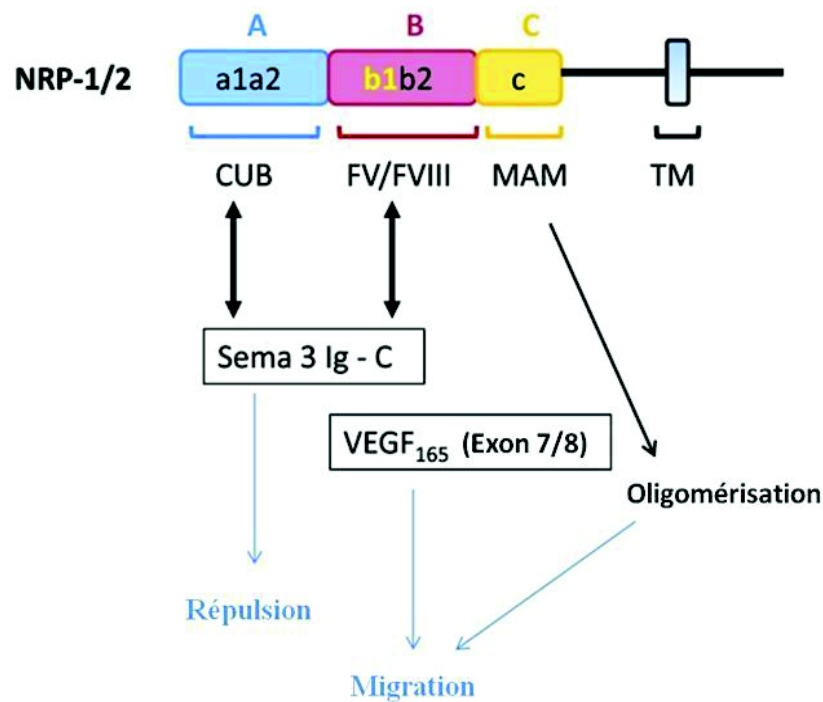


Figure 14. Schéma général de la structure des neuropilines et des domaines de liaison à leurs principaux ligands. Le domaine B électronégatif est capable d'interagir avec les domaines basiques C des sémaphorines de classe 3 (Sema 3) et les régions codées par les exons 7 et 8 du VEGF-A. Les Sémaphorines de classe 3 sont aussi capable d'interagir avec les domaines a1/a2 via les séquences Sema3 et Ig. Le domaine MAM assure l'oligomérisation nécessaire à la transduction du signal produit par les sémaphorines ou le VEGF. TM représente le domaine trans-membranaire (D'après Perrot-Applanat and Di Benedetto, 2012)

Les neuropilines possèdent une seule hélice transmembranaire et un court domaine intracellulaire (Figure 14). Les quatre domaines extracellulaires situés en N-terminal sont nécessaires et suffisants pour la fixation du ligand. Le domaine a1 interagit avec le domaine sema du ligand sema3. Le domaine b1 contient une poche de liaison spécifique à l'arginine en C-terminal et qui est nécessaire à la liaison du VEGF et de sémaphorine. De plus, les domaines b1 et b2 peuvent interagir pour former un domaine de résidus basiques impliqués dans la liaison de l'héparine, un membre des glycosaminoglycanes très riche en sulfate. Seules les isoformes du VEGF qui possèdent dans leur séquence la partie codée par les exons 7 et 8 et possédant une Arg/Lys en C-terminal sont capable d'interagir avec les NRPs (Parker et al., 2012). Récemment, un rôle de l'exon 5 du VEGF-A a aussi été impliqué dans la liaison à la neuropiline-1 (Delcombel et al., 2013). Cette interaction permet, en formant un complexe ternaire avec les VEGFRs, de stabiliser la liaison des ligands et de potentialiser la signalisation dépendante des VEGFRs.

Les résultats de certaines études visant à déterminer le rôle des neuropilines dans le développement vasculaire ont laissé penser que les neuropilines NRP1 et NRP2 avaient des fonctions redondantes dans ce cadre (Kawasaki et al., 1999; Soker et al., 2002). Cependant, l'expression des deux NRPs devient cloisonnée plus tard au cours du développement avec l'expression majoritaire de la neuropiline 1 dans les artères, alors que la neuropiline 2 est majoritairement exprimée dans les veines et les vaisseaux lymphatiques (Herzog et al., 2001; Yuan et al., 2002). D'autre part, les NRPs diffèrent aussi au niveau de leurs ligands VEGF. Alors que la NRP1 interagit avec les isoformes qui lient l'héparine du VEGF-A et B, la NRP2 interagit préférentiellement avec le VEGF-A, -C et -D (Hagberg et al., 2010; Takahashi and Shibuya, 2005). La délétion du gène de la NRP1 chez la souris est létale pour les embryons (Gu et al., 2003) notamment à cause de malformations vasculaires, alors que les souris NRP2 déficientes sont viables et ne démontrent que peu de défauts du système lymphatique (Yuan et al., 2002). La NRP1 serait aussi essentielle l'orientation des « *Tip cells* » au cours de l'angiogenèse (Gerhardt et al., 2004).

Les NRPs ont été d'abord caractérisé comme étant des récepteurs neuronaux pour les semaphorines de classe 3 (SEMA3) qui jouent un rôle important dans l'orientation des neurones (He and Tessier-Lavigne, 1997). Il est apparu par la suite que les NRPs jouaient le rôle de corécepteurs dans ce système en s'associant aux plexines qui sont les récepteurs

principaux des SEMA3. De la même manière que pour les VEGFs, les deux NRPs reconnaissent différents membres de la famille SEMA3. En effet la NRP1 se lie préférentiellement au semaphorine-3A, -3C et -3F, alors que la NRP2 va plutôt lier les semaphorine-3B, -3C, -3D, -3F (Djordjevic and Driscoll, 2013). Il faut aussi noter que les NRPs existent aussi sous formes solubles, trois formes de sNRP1 et une seule pour la sNRP2 ont été rapportées (Cackowski et al., 2004; Rossignol et al., 2000).

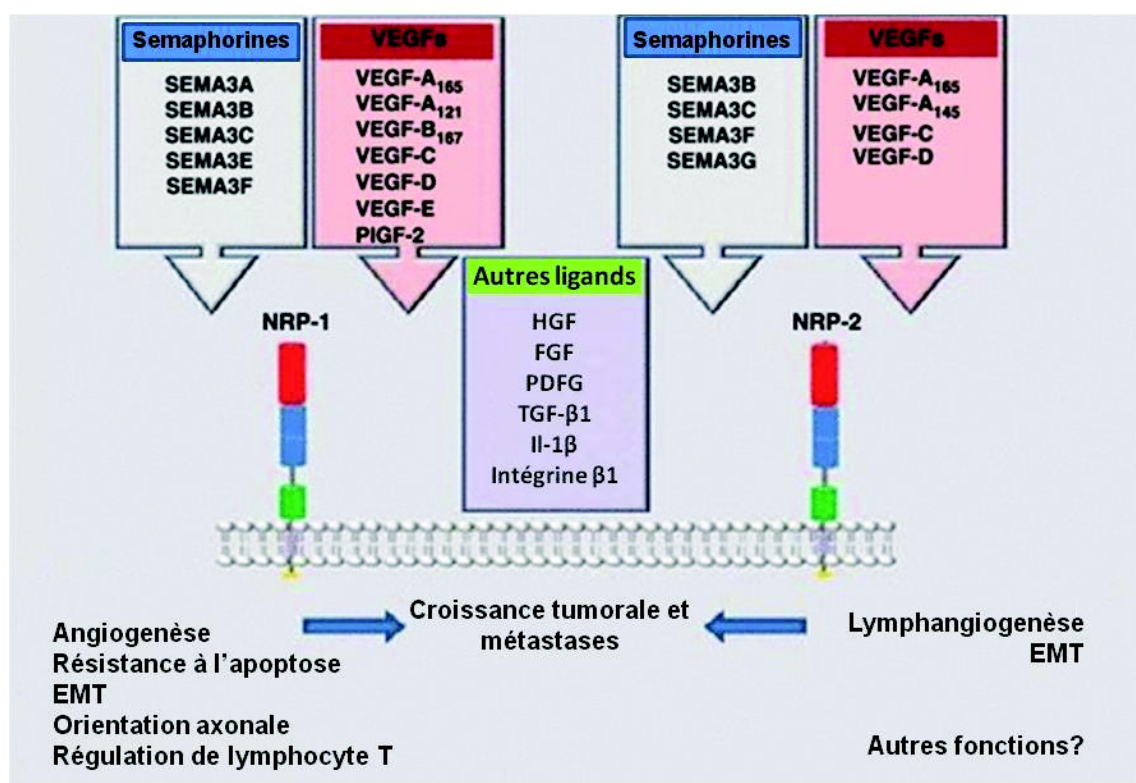


Figure 15. Les différentes familles de ligands interagissant avec les neuropilines et les divers effets en découlant (d'après Wild et al., 2012).

Très rapidement, une théorie selon laquelle les NRPs pouvaient aussi interagir avec d'autres protéines liant l'héparine a émergée (Figure 15). Cette suggestion fut rapidement corroborée avec la découverte de leur liaison avec les membres de la familles des FGFs, le FGF-1, FGF-2 et le FGF-4 (West et al., 2005), ainsi que la galectine-1 (Hsieh et al., 2008), le HGF (Hu et al., 2007), le TGF-β1 et le PDGF (Ball et al., 2010). Par conséquent, en plus de leurs rôles en tant que corécepteurs des plexines et des VEGFRs, les NRPs peuvent interagir avec d'autres récepteurs présents à la surface cellulaire. Une interaction c-MET, un récepteur à activité

tyrosine kinase qui lie le HGF, avec les NRPs a été décrite. Il a été montré récemment que la NRP1 et la NRP2 agissent en tant que corécepteurs fonctionnels pour le HGF en augmentant l'affinité de la liaison HGF/c-met conduisant à une augmentation du potentiel invasif des tumeurs (Hu et al., 2007; Matsushita et al., 2007; Sulpice et al., 2008). Par ailleurs, il a aussi été montré que les NRPs influençaient la signalisation dépendante du TGF- β 1. Notamment, la NRP1 a été décrite comme corécepteur de la forme latente et active du TGF- β 1 (Glinka and Prud'homme, 2008). Le TGF- β 1 étant un régulateur important de l'EMT (Zavadil and Böttinger, 2005). Cette capacité à lier différentes familles de récepteurs pourrait expliquer les fonctions variables des NRPs dans divers processus physiologiques et pathologiques au sein de différents tissus.

II.5.4.3. Les intégrines : de nouveaux corécepteurs pour les VEGFR

Les intégrines jouent le rôle de capteurs cellulaires en interagissant de manière étroite avec les composants de la matrice extracellulaire. Les intégrine sont capable de ce fait d'affecter le comportement des cellules en fonction des phénomènes qui se produisent dans leur environnement (Hynes, 2002). La capacité des intégrines à lier leurs ligands peut donc facilement être modifiée par différents stimuli. Dans ce cadre, il est important de souligner la capacité des intégrines à interagir avec différentes molécules présentes à la surface des cellules et notamment les récepteurs de facteurs de croissance (Ivaska and Heino, 2011). Récemment, le rôle des intégrines dans la promotion des cancers a suscité beaucoup d'intérêt. En effet, des études ont démontrées l'implication de ces protéines dans l'angiogenèse, notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ nécessaire à la survie et à la formation des vaisseaux sanguins durant ce processus (Varner et al., 1995). La liaison des intégrines à leurs ligands présents dans MEC résulte en le recrutement de protéines adaptatrices et en l'activation de médiateurs de signalisation intracellulaires, et de manière plus importante, le complexe FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et c-Src (Mitra and Schlaepfer, 2006).

Bien qu'une interaction VEGFR2/ intégrine $\alpha_v\beta_3$ ait été un mécanisme attractif pour intégrer les effets de survie et les fonctions angiogéniques exercées par le VEGF sur les CEs, il a été montré que les souris déficientes en intégrines β_3 ne présentait pas de défauts dans la néovascularisation rétinienne, un contexte angiogénique physiologique dans lequel l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été fortement impliqué (Hodivala-Dilke et al., 1999). Il a aussi été montré que dans les CEs, une signalisation dépendante du VEGFR2 et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ était impliquée dans la

motilité de ces cellules à travers la promotion de la formation de fibre de stress (Lamallice et al., 2007). Ce dernier résultat suggère que dans le cadre des fonctions angiogéniques du VEGF, les interactions entre VEGFR2 et intégrines peuvent jouer un rôle redondant. Cette hypothèse est soutenue par le fait que d'autres intégrines, comme l'intégrine $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$, ont également été impliquées dans la médiation de l'angiogenèse dépendante du VEGF (Senger et al., 1997). Par ailleurs, il a été montré que l'intégrine $\beta1$ formait des complexes avec le VEGFR2, cette association affecte la signalisation dépendante de ce récepteur dans les CEs (Chen et al., 2010). Cette association VEGFR2/intégrine $\beta1$ serait dépendante de l'expression du CD63 à la surface de ces cellules (Tugues et al., 2013).

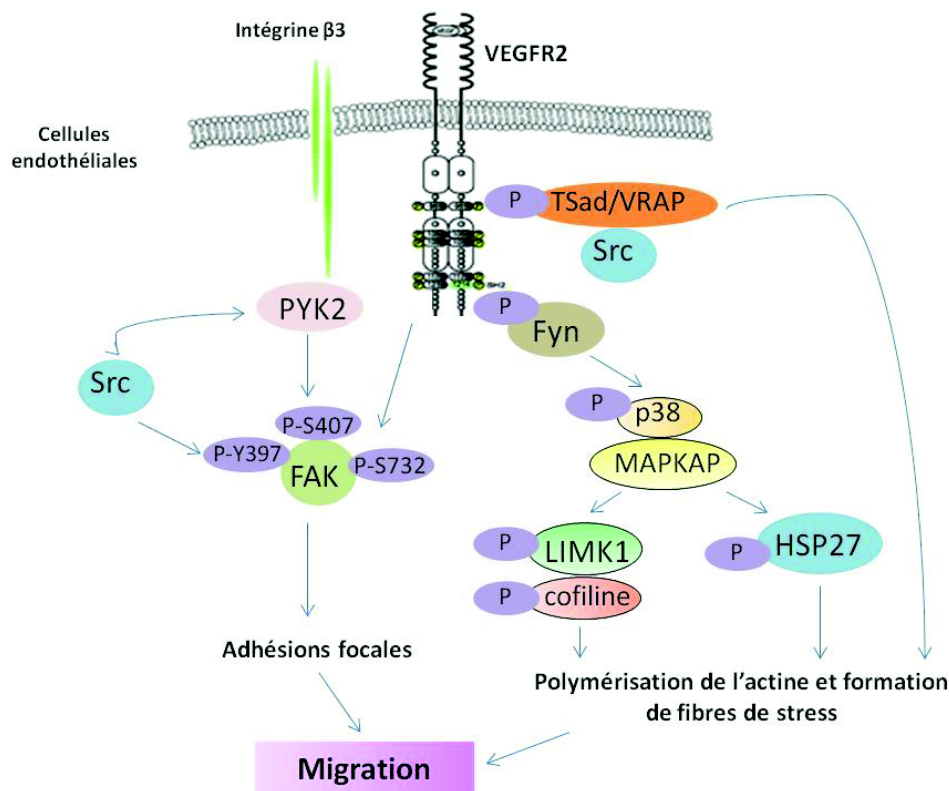


Figure 16. Représentation schématique des voies de signalisation activées suite à une collaboration VEGFR2/ intégrine $\beta3$ dans les cellules endothéliales. L'activation du VEGFR2 induit une autophosphorylation au niveau de son résidu Tyr1214. Il s'ensuit une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de p38MAPK, cette phosphorylation induit l'activation de MAPKAP K2 et de LIM kinase 1 qui contribuent à leur tour à augmenter la polymérisation de l'actine à travers la phosphorylation de la cofiline et de la HSP27. Cette activation du VEGFR2 est aussi capable d'activer FAK en induisant sa phosphorylation sur son résidu Ser732, ce qui produit un changement conformationnel permettant la phosphorylation de FAK au niveau de sa Ser407 par PYK2 en aval de l'intégrine $\beta3$ favorisant les adhésions focales. La convergence des deux voies permet aux cellules endothéliales de migrer en favorisant la contractilité de ces cellules. (d'après Lamallice et al., 2007)

Il a été décrit qu'une activation des intégrines dans les cellules tumorales serait un facteur important dans la promotion des cancers, ceci passerait par l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval y compris les voies FAK, ERK/MAPK, Src, Akt et ras. L'activation de ces voies était augmentée en présence de niveaux plus élevés d'intégrine $\beta 1$ (Jahangiri et al., 2014). De manière intéressante, de hauts niveaux d'intégrine $\beta 1$ ont été corrélés avec un phénotype plus invasif et avec l'apparition de métastases (Park et al., 2000), et il a aussi été montré que la signalisation dépendante de cette intégrine était impliquée dans la résistance aux thérapies, notamment les agents chimiothérapeutiques et les radiothérapies (Nam et al., 2009) mais aussi aux thérapies antiangiogéniques. En effet, une expression élevée d'intégrine $\beta 1$ serait impliquée dans la résistance aux BVZ dans les glioblastomes (Jahangiri et al., 2014), ceci suggère que des agents ciblant l'intégrine $\beta 1$ pourraient améliorer l'efficacité des agents anti-angiogéniques.

De manière intéressante, il apparaît que les intégrines sont aussi capables de lier les NRPs aussi bien dans les cellules tumorales que dans les CEs. Il a été montré que le VEGF était capable d'activer certaines intégrines dans les CEs (Byzova et al., 2000) et que ces intégrines pouvaient être régulées par la NRP1 (Valdembri et al., 2009). Il a aussi été rapporté que l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ inhibait la contribution de la NRP1 à l'angiogenèse en la séquestrant et en empêchant son interaction avec le VEGFR2 (Robinson et al., 2009). D'autre part, dans les cellules de cancer pancréatique, l'intégrine $\beta 1$ est capable de former des complexes avec la NRP1. Cette interaction intégrine $\beta 1$ /NRP1 est capable de moduler la survie, la croissance et le potentiel invasif des cellules tumorales (Fukasawa et al., 2007). Dans les cellules de cancers mammaires, la NRP2 apparaît comme un facteur important de l'activation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$. Dans ce modèle, l'activation de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ serait la résultante d'une signalisation dépendante de la formation du complexe VEGF-NRP2. Plus récemment, la formation du complexe NRP2/ $\alpha 6\beta 1$ a été impliquée dans l'initiation de cancers mammaires (Goel et al., 2012). De plus, il a été montré qu'une interaction entre la NRP2, présente à la surface des cellules de carcinomes rénaux à cellules claires, et l'intégrine $\alpha 5$ des CEs était capable de promouvoir l'extravasation des cellules tumorales, favorisant par ce moyen la formation de métastases (Cao et al., 2013). L'existence de complexes dans les cellules de CBnPCs et leur rôle potentiel reste encore à déterminer.

II.6. Fonctions paracrine et autocrine du VEGF-A : différents cibles cellulaires et différents effets des variants VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b

II.6.1. Action paracrine sur les cellules endothéliales

Comme mentionné plutôt, le rôle principal du VEGF-A est celui d'acteur clé de l'angiogenèse en agissant à travers une boucle paracrine de signalisation et en recrutant les cellules endothéliales pour former des néovaisseaux. Afin que les cellules endothéliales forment de nouveaux vaisseaux, le VEGF-A est capable de promouvoir la migration, la survie et la perméabilité au niveau de ces cellules. Ces effets passent par une signalisation dépendante de ses récepteurs.

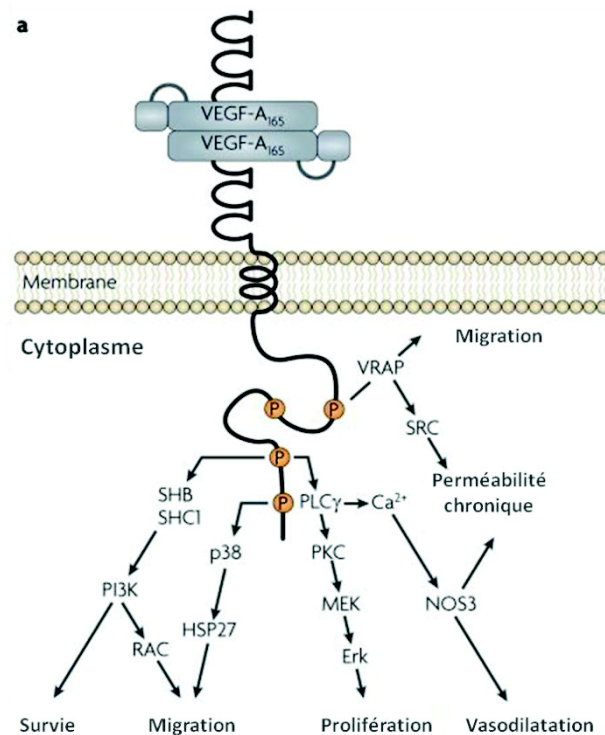


Figure 17. Représentation schématique des effets induits par la signalisation en aval des VEGF récepteurs dans les CEs. La réponse angiogénique est principalement induite par l'activité du récepteur VEGFR2 pour activer les multiples voies de signalisation en aval (*d'après Harper and Bates, 2008*)

II.6.1.1. Signalisation dépendante du récepteur VEGFR1

Le VEGFR1 (Flt-1, Fms-like tyrosine kinase-1), grâce à ses deux boucles extracellulaires Ig-like 2 et 3, le VEGFR1 est capable de lier avec une grande affinité les VEGF-A, VEGF-B et PlGF. Le VEGFR1 est capable de lier le VEGF-A avec une affinité supérieure à celle du VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994). Cependant, l'activité tyrosine kinase du VEGFR1 étant plus faible que celle du VEGFR2 (Figure 18), il a pendant longtemps été qualifié de régulateur négatif du VEGF-A et pendant longtemps on a pensé que c'était un récepteur leurre (Park et al., 1994). Cependant, même si la signalisation dépendant du VEGFR1 ne semble pas de la première importance dans l'angiogenèse, elle semble importante dans d'autres processus au cours du développement tumoral, notamment, la vasculogenèse, le chimiotactisme et la migration des monocytes et des macrophages, ainsi qu'au cours de l'hématopoïèse et de l'expression des métalloprotéases (MMPs) (Ferrara, 2004). Le VEGFR1 serait aussi important au cours du développement physiologique car les embryons *VEGFR1* ^{-/-} meurent après 9 jours de vie, principalement à cause de défauts de la formation des lumens des vaisseaux sanguins (Fong et al., 1995). Le VEGFR1 aurait une capacité d'autophosphorylation plus faible que celle du VEGFR2. Néanmoins, six sites principaux de phosphorylation en C-terminal ont été identifiés et comprennent les tyrosines 1169, 1213, 1242, 1309, 1327 et 1333 (Ito et al., 1998) (Figure 19). Ainsi, en dépit d'une faible capacité d'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase (Waltenberger et al., 1994), certaines molécules cibles intracellulaires en aval du VEGFR1 ont été identifiées. Parmi elles, la phospholipase-Cy (PLCy) (Sawano et al., 1997), la p38 MAPK, la phosphoinositide-3-kinase p85 (p85 PI3K) et le facteur de croissance lié au récepteur-2 (Grb-2) (Wittko-Schneider et al., 2013). *In vitro*, le VEGFR1 affecte la migration des cellules endothéliales à travers la modulation de la réorganisation des filaments d'actine par l'activation de p38 MAPK et de la paxilline (Kanno et al., 2000). Bien que peu décrites jusqu'à présent, des modifications post-traductionnelles autres que des phosphorylations sont capables de moduler l'activité du VEGFR1. Ainsi, l'histone méthyltransférase SMYD3 méthyle la lysine 831 du domaine kinase du VEGFR1, ce qui stimule l'activité kinase du récepteur «*in vitro*» et «*in vivo*» (Kunizaki et al., 2007). Il serait important de noter que les sites d'autophosphorylation du VEGFR1 varient selon le type de ligands impliqué. Ainsi, il a été montré que la liaison du VEGF₁₆₅ à ce récepteur induit une phosphorylation du résidu Tyr1213, alors que la liaison du PlGF induit une phosphorylation au niveau de la Tyr1309 (Autiero et al., 2003).

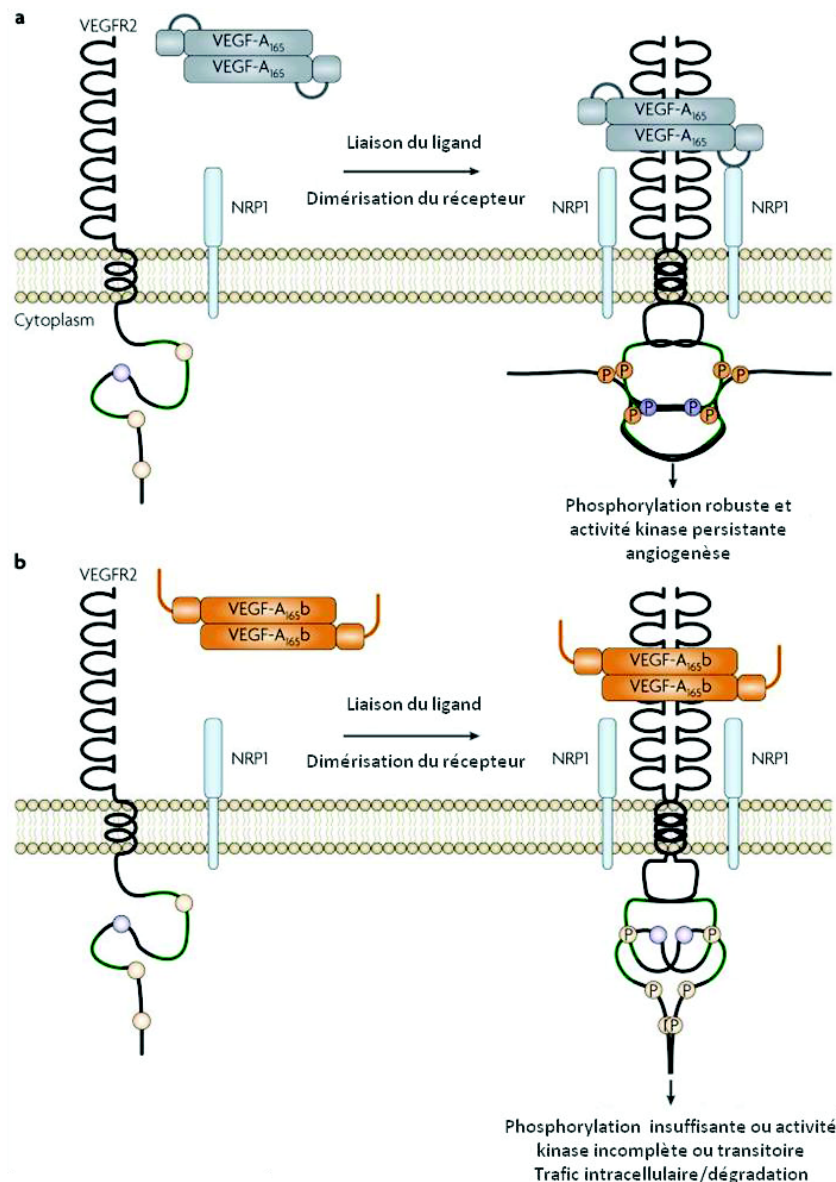


Figure 18. Interaction des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} avec leur récepteur VEGFR2 dans la cellule endothéliale. **a.** le dimère de VEGF₁₆₅ se lie au VEGFR2 et favorise la formation de dimères de récepteurs (il en est de même pour le VEGFR1) induisant l'activation des domaines kinase (lignes vertes) et la phosphorylation de résidus tyrosine 951, 1152 et 1214 (orange) et 1054 (violet). Le résultat d'une telle liaison est une fonction kinase persistante résultant des cis- et trans-phosphorylations soutenues des résidus tyrosine intracellulaires. Une phosphorylation robuste de la tyrosine conduit à l'activation des voies de signalisation angiogéniques. **B.** VEGF_{165b} lie VEGFR2 avec une affinité égale à VEGF₁₆₅ mais ne lie pas la neuropiline 1 (NRP1). Le domaine C-terminal du VEGF_{165b} est neutre et induit une rotation et une torsion insuffisante du dimère de récepteur VEGFR2 pour induire la phosphorylation de la tyrosine 1054. Des phosphorylations faibles d'autres tyrosines peuvent survenir. Par conséquent, les voies de signalisation angiogéniques ne sont que peu ou pas activées (d'après Harper et Bates, 2008).

Comme mentionné précédemment, il existe aussi une forme soluble du récepteur qui est issue d'un épissage alternatif, à savoir la rétention de l'intron 13, et qui conduit à la production d'un variant d'épissage codant pour une protéine VEGFR1 tronquée dépourvue de son domaine d'activité kinase (Yamaguchi et al., 2002). Cette isoforme qui ne possède pas de domaine transmembranaire est capable de lier le VEGF-A avec une affinité aussi importante que celle de la forme non soluble et est considérée de ce fait comme un régulateur négatif de l'angiogenèse (Ambati et al., 2006).

II.6.1.2. Signalisation dépendante du récepteur VEGFR2

Le VEGFR2 est le récepteur principal médiant les activités angiogéniques dans les cellules endothéliales. Il est en effet fortement exprimé à la surface de ces cellules ainsi qu'à la surface des progéniteurs endothéliaux circulants. Bien que le VEGFR2 possède une affinité plus faible pour le VEGF-A que le VEGFR1, son activité tyrosine kinase en réponse aux ligands est plus robuste (Waltenberger et al., 1994). Les membres de la famille VEGF_{xxx} fonctionnent lorsqu'ils sont en homodimère reliés par des ponts disulfure entre la Cys-51 et Cys-60 (Muller et al., 1997). Des expériences de mutagenèse dirigée ont identifié 3 résidus acides dans l'exon 3 et 3 résidus basiques dans l'exon 4 essentiels pour la liaison des VEGF_{xxx} aux VEGFRs. Cependant, les variants d'épissage VEGF_{xxx} ont des affinités différentes pour les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Dans les cellules endothéliales, la liaison du ligand VEGF₁₆₅ sur le récepteur VEGFR2 induit une dimérisation du récepteur, un repositionnement du domaine tyrosine-kinase par rotation du dimère conduisant à une autophosphorylation de différents résidus tyrosine (Tyr1054/1059, Tyr1214 et Tyr1175 chez l'Homme) et à l'activation du récepteur. Une fois activé, le récepteur VEGFR2 transactive plusieurs cascades de transduction du signal, incluant les voies PI3K/AKT, p42/44 MAPK et p38MAPK, qui contrôlent la migration, la perméabilité et la prolifération des cellules endothéliales (Roskoski, 2007). Il a été montré que des deux sites majeurs d'autophosphorylations dans le VEGFR-2, la phosphorylation des résidus Tyr1175 mais pas du Tyr1214 (Figure 19) était essentiels à la prolifération des cellules endothéliales induite par la stimulation au VEGF-A (Takahashi and Shibuya, 2005). Une mutation phénylalanine (F) du VEGFR2 ou l'utilisation d'un anticorps ciblant la phospho-Tyr1175 (Figure 19) inhibe significativement la prolifération induite par le

VEGF-A. De plus, la phosphorylation Tyr1175 a été décrite comme étant le site de liaison et d'activation de la phospholipase C (PLC)- γ , qui active à son tour la voie PKC-Ca⁺⁺-c-Raf-MEK-MAPK. Tout comme le VEGFR1, le VEGFR2 est aussi capable d'être méthylé sur de multiples résidus Arginine et Lysine, incluant le résidu Lysine 1041. Cette méthylation est indépendante de la liaison du ligand VEGF-A mais elle augmente la phosphorylation sur résidu tyrosine et l'activité kinase du récepteur en présence de ligand (Hartsough et al., 2013). Elle est nécessaire à l'angiogenèse induite par le VEGFR2 dans des modèles de xénogreffes tumorales chez la souris ou chez le poisson-zèbre (Hartsough et al., 2013). De façon intéressante, l'acétylation du VEGFR2 par l'acétyltransférase p300 a aussi été très récemment décrite et impliquée dans le contrôle de la phosphorylation du VEGFR2 (Zecchin et al., 2014). Ces données suggèrent que le contrôle de l'activité du VEGFR2 implique bien d'autres mécanismes post-traductionnels que sa phosphorylation. Elles sont aussi intéressantes dans la mesure où elles identifient de nouvelles cibles thérapeutiques pour moduler l'activité de ce récepteur.

A ce jour, on ne sait pas réellement quel VEGF_{xxx} active préférentiellement telle ou telle voie de signalisation. Cependant, il a été décrit que l'isoforme VEGF₁₆₅ est l'isoforme la plus bioactive et est la seule qui peut récapituler le phénotype tumorigénique dans des cellules murines VEGF^{-/-} (Grunstein et al., 2000). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'isoforme VEGF₁₆₅ mais pas l'isoforme VEGF₁₂₁, par exemple, permet la formation d'un complexe ternaire VEGFR2/NRP1 (Soker et al., 2002), tandis que le VEGFR2 augmente l'interaction NRP1/VEGF₁₆₅ mais pas VEGF₁₂₁/NRP1 (Pan et al., 2008). De plus, il a été montré que le VEGF₁₆₅ sous sa forme soluble induit une phosphorylation robuste du résidu tyrosine 1175, ce qui résulte en une activation de la phospholipase C γ , et du phosphoinositide 3-kinase et l'activation de la voie RAF-MEK-ERK (Takahashi et al., 1999). Ces événements sont cruciaux pour l'activation et l'expression des gènes pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales, parce qu'ils conduisent particulièrement à la production de métalloprotéases matricielles qui sont requises pour la dégradation de la membrane basale et de ce fait la migration des cellules endothéliales et donc l'angiogenèse (Harper and Bates, 2008). D'autre part, le VEGF₁₆₅ lié à la matrice extracellulaire induit une signalisation, différente de la fraction soluble de cet isoforme, marquée essentiellement par une activation prolongée du VEGFR2 avec une phosphorylation persistante du résidu Tyr1214 et de la p38MAPK (Chen et al., 2010).

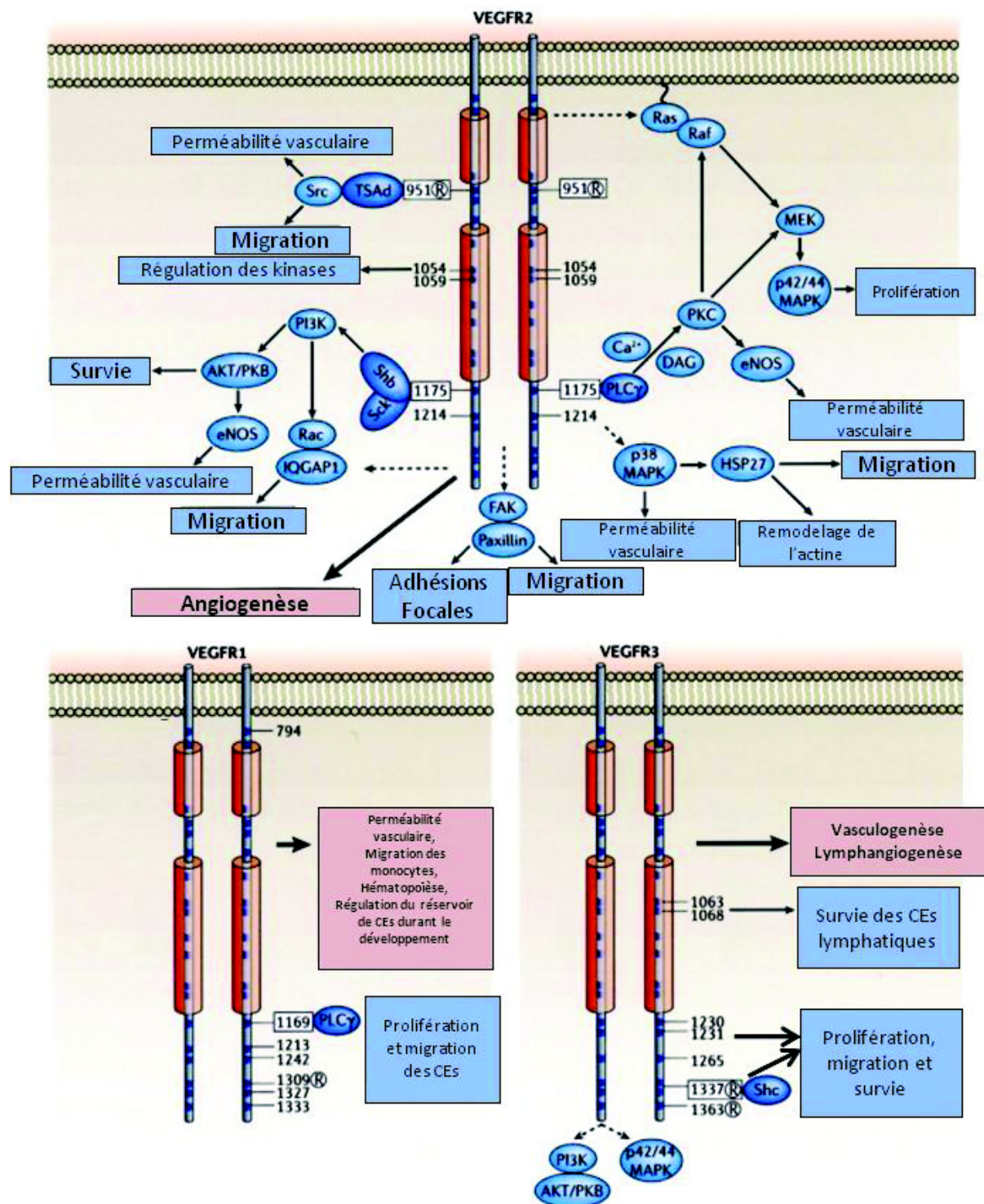


Figure 19. Les principaux sites de phosphorylation dans les VEGFRs et leurs effets. Les domaines intracellulaires des VEGFRs sont représentés avec des résidus tyrosine phosphorylés, les chiffres qui figurent sur le schéma correspondent aux numéros des résidus tyrosine en question. (D'après Koch and Claesson-Welsh, 2012; Roskoski, 2007).

Ces données démontrent que la capacité à se lier à la matrice extracellulaire de chaque isoforme conditionne la signalisation dépendante du VEGF. Cette signalisation dépend aussi de l'affinité de chaque isoforme pour ses récepteurs. L'isoforme VEGF₁₂₁ qui est court et diffusible possède une affinité réduite pour le VEGFR1 et le VEGFR2, alors que l'isoforme long VEGF₁₈₉ se lie préférentiellement au VEGFR1 à moins d'être clivé par des protéases. Le VEGF₁₆₅ montre un profil intermédiaire et lie les deux récepteurs avec une bonne affinité.

Les isoformes VEGF_{xxx}b conservent leur capacité à lier les VEGFRs et à se dimériser, mais elles ne lient pas les neuropilines. De ce fait, bien que l'isoforme VEGF₁₆₅b lie le VEGFR2 avec une plus forte affinité que VEGF₁₆₅, elle est incapable d'activer efficacement la cascade de signalisation dépendante du VEGFR2 (Cébe Suarez et al., 2006; Delcombel et al., 2013; Kawamura et al., 2008). Il a été montré que le VEGF₁₆₅b induit une rotation insuffisante du VEGFR2 qui résulte en une autophosphorylation incomplète de la tyrosine intracellulaire Tyr-1054 et conduit donc à une activation faible et transitoire du VEGFR2 (Harper and Bates, 2008; Kawamura et al., 2008).

Jusqu'à récemment, on pensait que la signalisation dépendante des récepteurs à activité tyrosine kinase (TK) ne se produisait qu'à la membrane plasmique. Dans ce schéma, la liaison du ligand induisait la phosphorylation du récepteur et de manière concomitante activait les voies de signalisation en aval. Simultanément, l'endocytose des complexes ligand/récepteur est sensée mettre un terme à cette signalisation à travers la dégradation des récepteurs. Par la suite, d'autres études ont montrées que ce schéma était trop simpliste. En effet, il est apparu que pour plusieurs récepteurs à activité TK, la transduction du signal ne se produit qu'après internalisation de ces récepteurs indiquant que le processus d'endocytose affecte la signalisation dépendante de ces récepteurs (Sorkin and von Zastrow, 2009).

Après liaison du VEGF-A, le VEGFR2 est endocyté dans des vésicules à clathrine et est destiné soit à être recyclé à la membrane plasmique soit à la dégradation protéasomale ou lysosomale. Il a été prouvé que le parcours intracellulaire du VEGFR2 dépend en grande partie du cargo dans lequel il transite. Alors que l'isoforme VEGF₁₆₅ induit une internalisation du VEGFR2 et son transite à travers les vésicules Rab5/Rab4/Rab11, qui aboutit à un recyclage vers la membrane plasmique, la liaison du VEGF₁₆₅b redirige le

VEGFR2 vers les vésicules Rab7 (Ballmer-Hofer et al., 2011). Dans cette étude réalisée dans les cellules endothéliales et publiée par Ballmer-Hofer et collaborateurs, il a été montré que le VEGFR2 est retrouvé dans les vésicules Rab 4 et Rab 5 (Figure 20) dans les cellules non stimulées au VEGF₁₆₅. Après stimulation au ligand, le VEGF₁₆₅ induit principalement un trafic du VEGFR2 dans les vésicules Rab 11, alors qu'après stimulation au VEGF_{165b}, le VEGFR2 est retrouvé dans les vésicules Rab7 et est absent des vésicules Rab11. Dans la même étude, il est apparu que le transit du VEGFR2 dans les vésicules Rab11 (figure 20) après liaison au VEGF₁₆₅ soit dû au fait que ce ligand puisse se lier à la NRP1, car en absence de celle-ci, le VEGFR2 était retrouvé dans les vésicules Rab7. Ces résultats montrent que ces différences au niveau du parcours intracellulaire du VEGFR2 après la liaison de ces ligands ne se produisent que dans les cellules exprimant les VEGFR2 et la NRP1 simultanément et que l'élément déterminant ce parcours serait la capacité du ligand à lier la NRP1.

Après internalisation, le VEGFR2 à l'instar d'autres récepteurs TK, continu à signaler et l'intensité de cette signalisation dépend en grande partie du compartiment endosomal dans lequel il se trouve et de son trafic intracellulaire par la suite (Eichmann and Simons, 2012). Un fait important, est que le VEGFR2 phosphorylé après liaison du VEGF₁₆₅ est, par la suite, déphosphorylé avant d'être transféré dans les vésicules Rab11 puis recyclé à la membrane plasmique (figure 20). Le VEGFR2 qui est destiné à la dégradation reste quant à lui phosphorylé. Par conséquent, la signalisation en aval ne se termine que lorsque les vésicules fusionnent avec un lysosome. Il existe donc une signalisation intracrine dépendante de l'endocytose du VEGFR2 et induite par le VEGF-A. Cette thèse est soutenue par le fait que l'activation de ERK suite à l'activation du VEGFR2 semble survenir de manière prédominante lorsque ce récepteur se trouve dans le compartiment endosomal (Eichmann and Simons, 2012; Gourlaouen et al., 2013; Lanahan et al., 2010).

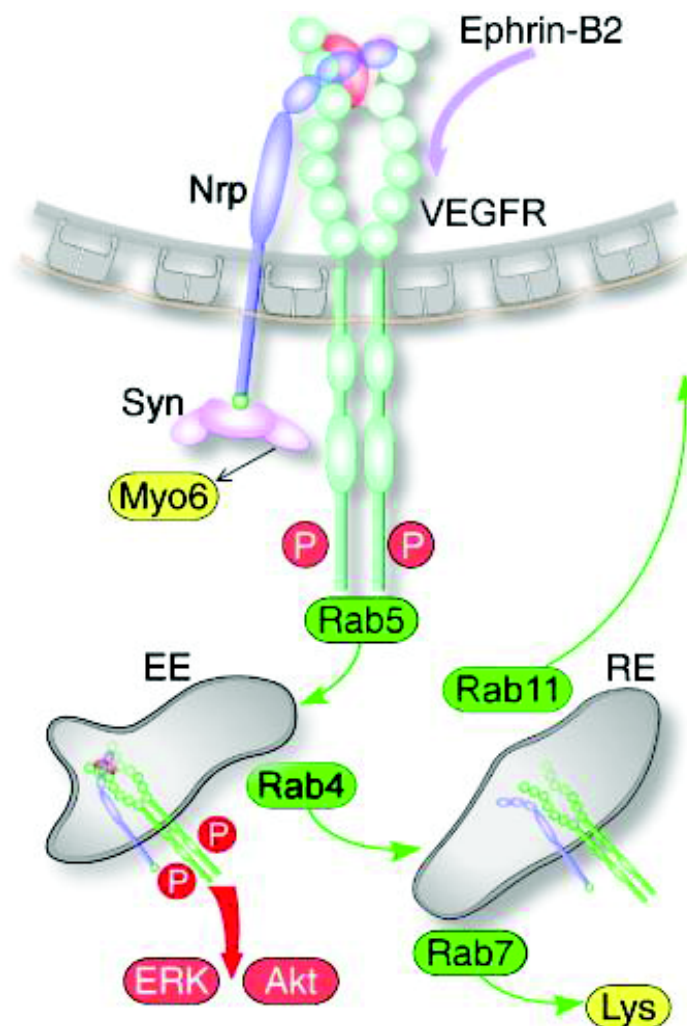


Figure 20. Schéma général du trafic membranaire et de la signalisation dépendante du VEGFR et des NRPs. La liaison du VEGF-A induit une autophosphorylation du VEGFR2 sur plusieurs résidus tyrosines et son association aux NRPs. L'engagement de l'éphrine-B2 est nécessaire pour l'endocytose du VEGFR. La mobilité des vésicules d'endocytose est assurée par la myosine VI (myo6) liée au NRP via la synéctine, qui sera transportée jusqu'au endosomes précoces (EE) avec les NRPs via les vésicules Rab5. A partir des endosomes précoces, le trafic des complexes NRP/VEGFR sont redirigés vers des endosomes de recyclage (RE) via des vésicules Rab4, puis seront soit recyclés à la membrane plasmique par le biais des vésicules Rab11, soit redirigés vers les lysosomes via les vésicules Rab7. Le VEGFR2 serait capable d'activer Akt et ERK à partir des endosomes précoces (*D'après Horowitz and Seerapu, 2012*).

II.6.2. Les neuropilines : action dépendante ou indépendante des VEGFR

Les principaux rôles connus des NRPs sont leur fonction en tant que corécepteurs des VEGFRs. Toutes les isoformes VEGF_{xxx} sont capables de lier la NRP1 (Delcombel et al., 2013). Le rôle joué par la NRP1 dans la potentialisation de la signalisation VEGF/VEGFR2 a été largement étudié essentiellement dans le cadre de l'angiogenèse. Alors que la liaison du VEGF au VEGFR seul n'induit qu'une faible activité kinase, la liaison aux NRPs est requise pour une activité kinase suffisamment soutenue pour pouvoir induire une cascade de signalisation pro-angiogénique (Becker et al., 2005; Soker et al., 2002). Il semblerait que la NRP1 potentialise la signalisation dépendante du VEGFR2, en stabilisant la liaison du VEGF-a à celui-ci (Harper and Bates, 2008). De manière intéressante, une expression aberrante a été observée dans plusieurs cancers (Kreuter et al., 2006; Miao et al., 2000; Vacca et al., 2006) des NRPs favoriserait l'agressivité des tumeurs et la formation de métastases *in vivo* dans plusieurs types de tumeurs solides (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). Dans ce contexte, il a été montré qu'une signalisation autocrine induite par le VEGF-A et dépendante des NRPs serait critique pour la survie, la croissance et la migration des cellules tumorales (Bachelder et al., 2003, 2001; Bagci et al., 2009; Cao et al., 2013). Certaines études soutiennent la théorie selon laquelle les NRPs pourraient signaler indépendamment des VEGFRs pour réguler la migration et l'adhésion des cellules endothéliales (Murga et al., 2005; Wang et al., 2003). Cette théorie est soutenue par des résultats montrant que même dans les cellules de carcinomes mammaires qui n'expriment pas le VEGFR2, le VEGF-A est capable d'induire une signalisation autocrine dépendante des NRPs pour promouvoir la survie de ces cellules (Bachelder et al., 2001). Il a aussi été démontré que la NRP1 promouvait l'adhésion à la matrice extracellulaire à travers un mécanisme dépendant du VEGF (Robinson et al., 2009). La NRP2 joue aussi un rôle dans la dissémination des métastases en promouvant l'attachement des cellules tumorales aux cellules endothéliales des vaisseaux avoisinants à travers une interaction NRP2/intégrine $\alpha 5$ (Cao et al., 2013). Récemment, un nouveau processus par lequel la NRP1 pourrait réguler la signalisation induite par VEGF-A a été décrit. En effet, Koch et collaborateurs ont montré qu'une présentation dite en *Cis* du VEGF-A par la NRP1 (le VEGFR2 et la NRP1 présentatrice sont présents à la surface de la même cellule) induit la formation d'un complexe ternaire VEGF-A/VEGFR2/NRP1 qui est rapidement internalisé. D'autre part, une présentation du VEGF-A par la NRP1 dite en *Trans* (le VEGF-A est présenté par une NRP1 qui se trouve à la surface d'une cellule adjacente) induisait un retard dans la formation du complexe a été retardée et la phosphorylation de la

phospholipase Cy (PLCy) et de ERK2 a été prolongée. Cette étude révèle que la NRP1 peut moduler la signalisation VEGFR2 et inhiber l'angiogenèse grâce à une communication en *Trans* (Koch et al., 2014).

II.6.3. Expression tumorale des récepteurs et des corécepteurs : action autocrine du VEGF-A

L'hypothèse selon laquelle la signalisation VEGF-A contribue aux fonctions des cellules tumorales implique que les cellules tumorales expriment des récepteurs de VEGF spécifiques qui assurent la médiation de cette signalisation. En accord avec cette idée, de nombreux travaux ont décrit l'expression des VEGFR mais aussi des NRPs dans plusieurs tumeurs solides. L'expression des VEGFRs a notamment été rapportée dans les cancers mammaires, dans lesquelles le VEGFR2 semble être largement exprimé (Perrot-Applanat and Di Benedetto, 2012; Vermeulen et al., 2010), dans les tumeurs pancréatiques (Smith et al., 2011), dans les cancers de l'ovaire (Masoumi Moghaddam et al., 2012), les cancers pulmonaires à petites cellules (Kajdaniuk et al., 2011) et les CBnPC (Chatterjee et al., 2013; Lantuéjoul et al., 2003) (Tableau 2). De la même façon, l'expression anormale des NRP1 et 2 a aussi été décrite dans de nombreux types tumoraux tels que les cancers du cerveau, du sein, du colon, du poumon (Goel and Mercurio, 2013) (Tableau 2) et associée à un phénotype invasif. Ainsi, les cancers de la prostate expriment de hauts niveaux de NRP1 (Yacoub et al., 2009). Des études précliniques ont montré que la NRP1 jouait un rôle dans la migration, la prolifération et l'invasion dans les cancers du poumon (Cao et al., 2008; Hong et al., 2007). Dans les cancers mammaires, l'expression des deux NRPs est associée à un mauvais pronostic (Yasuoka et al., 2009). Il a aussi été montré que NRP1 jouait un rôle dans une signalisation autocrine dépendante du VEGF-A dans la promotion des cancers mammaires (Bachelder et al., 2001). L'ensemble de ces données valide donc la possibilité de l'existence d'une boucle autocrine dépendante du VEGF-A dans les tumeurs (Figure 21).

Récepteur	Cancer
VEGFR2	Vessie, cerveau, sein, cervical, colon, endométrial, gastrique, tête et cou, hépatocellulaire, poumon, mélanome, myélome multiple, leucémies myéloïdes œsophageal, ovarien, pancréatique et prostatique, carcinome rénal, et thyroïdien.
VEGFR1	Vessie, cerveau, sein, colon, tête et cou, poumon, mélanomes, mésothéliome, leucémies myéloïdes, œsophageal, ovarien, pancréatique et prostatique.
NRP1	Cerveau, sein, colon, poumon, mélanome, ovarien, pancréatique et prostatique.
NRP2	Vessie, sein, colon, poumon, mélanome, ovarien, pancréatique, prostatique et rénal.

Tableau 2. Expression des VEGFRs et des NRPS dans les tumeurs humaines. (*D'après Goel and Mercurio, 2013*)

Dans les CBnPCs, l'existence d'une telle boucle autocrine a récemment été décrite via la démonstration que le VEGF-A stimule sa propre traduction par un mécanisme mettant en jeu l'activation du récepteur VEGFR2 et la voie mTOR (Chatterjee et al., 2013). Cette boucle autocrine est active « *in situ* » et conditionne un phénotype plus angiogénique chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires. Dans certaines tumeurs, la co-expression des récepteurs VEGFR en association à l'expression élevée de VEGF-A a été corrélée à un mauvais pronostic (Sakamoto et al., 2008; Smith et al., 2011), sous-tendant le dogme selon lequel la boucle autocrine dépendante des VEGF-A/VEGFR dans les tumeurs promeut la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Masoumi Moghaddam et al., 2012; Medinger et al., 2010; Perrot-Applanat and Di Benedetto, 2012; Smith et al., 2011; Vermeulen et al., 2010).

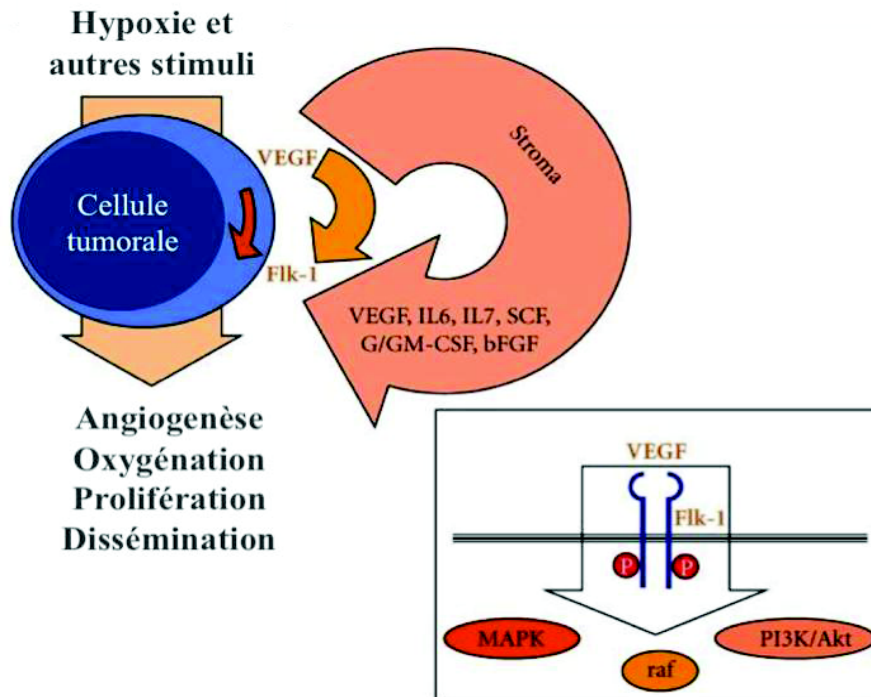


Figure 21. Effets autocrines du VEGF sur les cellules tumorales. Le VEGF sécrété par les cellules tumorales agit de manière autocrine en se liant au VEGFR2 (Flk-1) et induit divers effets impliqués dans la survie et l'agressivité des tumeurs (D'après Medinger et al., 2010).

Dans ce contexte, différents acteurs, voies moléculaires et conséquences phénotypiques ont été décrits selon les types tumoraux considérés. Dans les CBnPCs, le VEGF₁₆₅ antagonise l'apoptose induite par la sémaphorine-3 (Castro-Rivera et al., 2004). Dans les tumeurs de la peau, une boucle autocrine dépendante du VEGFR1 et la NRP1 agit en synergie avec la voie de l'EGFR pour activer la signalisation dépendante des kinases ERKs et promouvoir la tumorigénèse (Lichtenberger et al., 2010). Dans les gliomes, une boucle autocrine VEGF-A/VEGFR2/NRP1 induit la survie de cellules possédant des caractéristiques de cellules souches (Hamerlik et al., 2012). De façon importante, cet effet est induit par une signalisation intra-cytoplasmique du VEGFR2 qui échappe de ce fait au traitement anti-angiogénique BVZ. Ces données impliquent possiblement la signalisation intracrine des VEGFR dans le contrôle de la boucle autocrine dépendante du VEGF-A tel que démontré pour le VEGFR1 dans les cancers du sein (Lee et al., 2007). Le rôle d'une boucle autocrine dépendante du VEGF-A, impliquant la signalisation VEGFR2 et NRP1, a été mis en évidence dans le maintien et le renouvellement de cellules souches (figure 22) cancéreuses dans les cancers de la peau, mais aussi dans l'initiation du processus invasif de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Goel and Mercurio, 2013) . Ainsi, le VEGF-A induit une EMT de cellules épithéliales

normales et de cellules de carcinomes différenciées (Mak et al., 2010; Wanami et al., 2008). Tout comme dans les CEs, le VEGF-A apparaît également capable de favoriser les connections entre les voies de signalisation dépendantes des VEGFR et des intégrines dans les cellules tumorales. Ainsi, le VEGFR2 activé par son ligand active de multiples intégrines via la voie PI3K/AKT (Byzova et al., 2000). A l'inverse, les intégrines peuvent conditionner l'activation des VEGFR, comme montré pour l'intégrine $\alpha v\beta 3$ qui interagit avec le VEGFR2 et augmente son niveau de phosphorylation en réponse au VEGF-A (Soldi et al., 1999).

Cependant, étant donné que certaines cellules tumorales, comme celles des cancers mammaires, n'expriment que peu ou pas les VEGFRs mais semblent répondre quand même à une signalisation autocrine induite par le VEGF (Perrot-Applanat and Di Benedetto, 2012), on peut en déduire que d'autres types de récepteurs contribuent à cette signalisation dans ces cellules. Dans ce contexte, au cours de ces dernières années, l'étude du rôle des NRPs dans l'initiation et la progression tumorale a suscité beaucoup d'intérêt. La notion d'effet du VEGF-A sur une signalisation dépendante des NRPs mais indépendante des VEGFR est importante car elle pourrait participer à l'échappement des cellules tumorales à certaines thérapies anti-angiogéniques telles que le BVZ. En effet, il a été montré que cet anticorps prévient l'interaction du VEGF-A avec ses récepteurs mais ne prévient pas son interaction avec les NRPs. Parmi les effets du VEGF-A indépendants des VEGFR1/VEGFR2 mais mettant en jeu les NRP qui ont été rapportés on trouve, par exemple, l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la NRP1 et de l'oncogène RAS dans les carcinomes rénaux (Cao et al., 2012), ou une boucle dépendante des protéines NRP2/Bmi-1/IGF1R dans les cancers prostatiques agressifs (Goel et al., 2012). La NRP2 liée au VEGF-A est aussi capable d'interagir avec l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ dans les cancers du sein conduisant à l'activation de la kinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*), la formation d'adhésions focales et une modification de la polymérisation de l'actine (Goel et al., 2012).

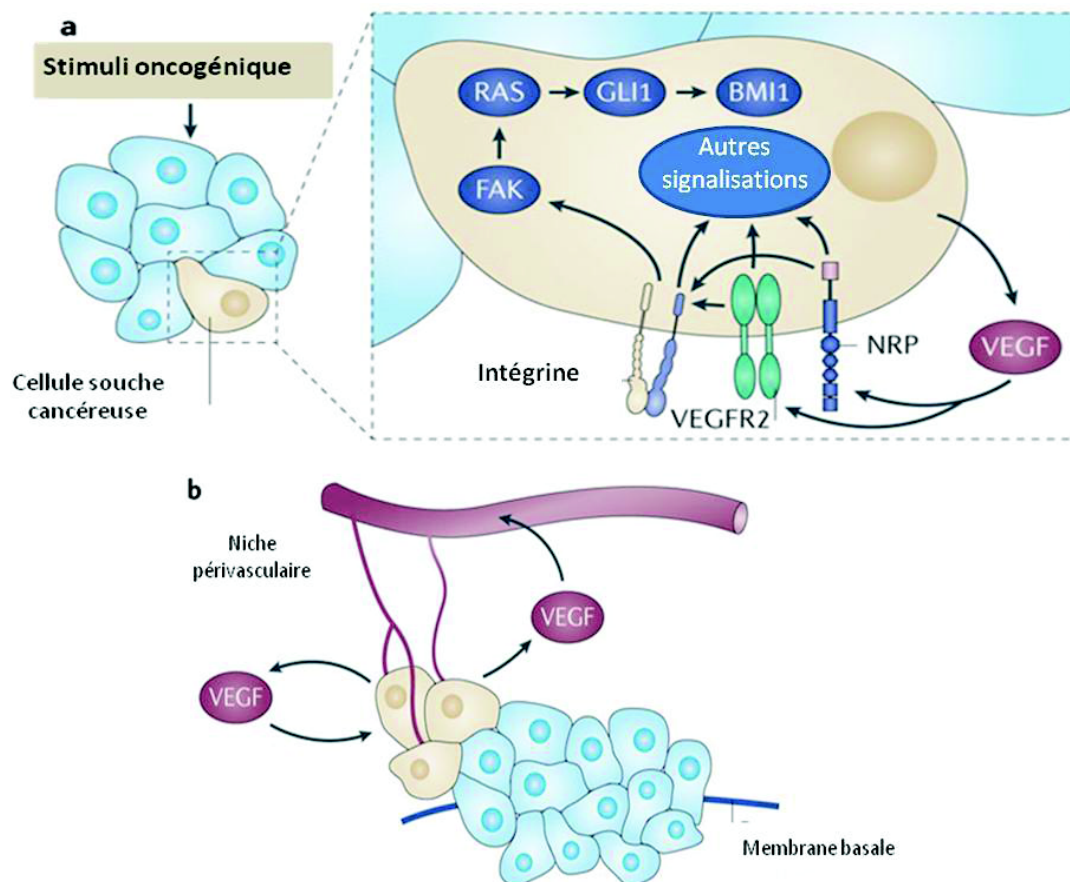


Figure 22. Fonction autocrine du VEGF dans les cellules tumorales. a . L'expression du VEGF et de ses récepteurs (VEGFR2) est induite de manière concomitante avec la transformation induite par les oncogènes, ce qui facilite la mise en place de la signalisation autocrine dépendante du VEGF. Cette signalisation, qui est principalement induite par l'activation du VEGFR2 et par les NRP pourrait être nécessaire pour la fonction des cellules souches cancéreuses (cellules beige), car elle semble participer au maintien de la taille du réservoir de cellules souches et à son renouvellement. La signalisation autocrine du VEGF dépendante des NRP et des intégrines régule l'expression de GLI 1 membre de la famille des récepteurs en doigt de zinc GLI, et le répresseur du groupe Polycomb BMI-1. **b.** les cellules souches cancéreuses peuvent être localisées dans une niche périvasculaire, ce qui permet au VEGF sécrété par ces cellules d'agir de manière paracrine pour stimuler l'angiogenèse dans les tumeurs naissantes. La signalisation autocrine VEGF peut également promouvoir la dé-différenciation et un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui entraîne une augmentation de la migration et de l'invasion des cellules tumorales dans le stroma (*d'après Goel and Mercurio, 2013*).

Finalement, l'un des mécanismes proposés pour expliquer la contribution du VEGF-A dans l'initiation tumorale serait qu'il est capable de réguler la taille du réservoir de cellules souches et leur renouvellement dans les tumeurs. Dans ce contexte, il a été proposé que les signalisations dépendantes du VEGFR1 ou VEGFR2 puissent conditionner la prolifération ou le phénotype cellules souches, respectivement. Cela pourrait aussi dépendre de la présence

simultanée ou non des 2 récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 à la surface de la cellule, de même que de la présence ou non de leurs corécepteurs, voir même des autres partenaires potentiels (autres récepteurs à activité tyrosine kinase, intégrines). De plus, cela pourrait aussi dépendre du type d'isoformes du VEGF-A, un aspect qui n'a jusqu'à aujourd'hui suscité que très peu d'intérêt.

Cependant, d'autres études plus récentes indiquent que les fonctions autocrines du VEGF-A sur les cellules tumorales pourraient être plus complexes qu'envisagé jusqu'alors. Ainsi, les patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux et exprimant de hauts niveaux de VEGF-A, associés à de hauts niveaux des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 ont contre toute attente une meilleure survie sans progression (Pajares et al., 2012). Ces tumeurs sont d'ailleurs résistantes aux thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGFR2, telles que le sunitinib ou l'anticorps anti-VEGFR2 DC101, dans un modèle murin induit de carcinome pulmonaire squameux (Larrayoz et al., 2014). De plus, dans les glioblastomes, l'isoforme VEGF₁₆₅ régule négativement la migration des cellules tumorales et l'invasion en supprimant l'activation du récepteur MET dépendante de l'HGF, via le recrutement de la protéine PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) au sein d'un hétérodimère MET/VEGFR2 (Xie et al., 2012). En accord avec un rôle distinct des différents variants d'épissage du VEGF-A sur la boucle autocrine également, le VEGF₁₈₉ induit l'apoptose de cellules de cancer du sein, alors que le VEGF₁₆₅ agit comme un facteur de survie dans les mêmes cellules (Vintonenko et al., 2011). De la même façon, bien que peu nombreuses, des études ont aussi suggéré un rôle autocrine des isoformes VEGF_{xxx}b. Dans un modèle de xénogreffes dérivées de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires A549, les tumeurs démontrent une croissance plus rapide lorsqu'elles surexpriment l'isoforme VEGF₁₆₅b ou VEGF₁₂₁b comparativement au contrôle (Catena et al., 2010). Bien que les auteurs n'aient pas approfondi les mécanismes moléculaires mis en jeu, cet effet est indépendant d'un effet sur l'angiogenèse détecté par un marquage CD31 suggérant l'existence d'une boucle autocrine. Là encore, les conséquences de cette boucle autocrine dépendante du VEGF-A pourraient différer selon le type cellulaire, le niveau d'expression des récepteurs et corécepteurs, et la balance d'expression entre les différentes isoformes du VEGF-A. Plus généralement, les effets du VEGF-A sur les cellules tumorales impliquent que les thérapies visant à inhiber ses fonctions, et développées initialement pour cibler la néo-angiogenèse tumorale, ont aussi un impact direct sur les cellules tumorales.

PARTIE III : Les thérapies anti-angiogéniques

Le traitement par des agents chimiothérapeutiques présentant de nombreux effets secondaires, les efforts de la recherche pendant la dernière décennie se sont de plus en plus dirigés vers le développement de thérapies ciblées afin de réduire les effets hors cibles de ces agents. Dans ce contexte, l'identification d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques affectant des gènes clés du processus de tumorigenèse, un exemple majeur étant les mutations de l'EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires, a conduit au développement de thérapies ciblant ces anomalies et à la sélection des patients susceptibles d'en bénéficier, l'ensemble résumé sous l'appellation de thérapie ciblée et personnalisée. L'une de ces nouvelles stratégies thérapeutiques consiste à cibler la néo-angiogenèse en tant que facteur clé du développement tumoral au lieu de cibler la prolifération cellulaire de manière non spécifique comme observé avec les agents chimiothérapeutiques.

III.1. Présentation générale des thérapies anti-angiogéniques

Parmi les patients atteints de CBnPC, au moins 51% présentent un syndrome métastatique. Une chimiothérapie palliative améliore la survie globale des patients et la qualité de la vie comparativement aux soins de support. Pour l'instant, il n'existe pas de protocole standardisé pour le traitement en première ligne des CBnPCs. Les patients démontrent une survie globale d'environ 8 à 10 mois suite à un traitement basé sur l'usage de sels de platines, ce qui constitue la limite de ces thérapies (Schiller et al., 2002). Une meilleure compréhension du rôle joué par l'angiogenèse dans le développement tumoral et l'identification du VEGF-A en tant que facteur clé de ce processus ont fait de la voie VEGF/VEGFR une cible de choix pour des agents visant à inhiber la croissance des tumeurs en interférant avec la formation de néo-vaisseaux et donc en les privant d'apport sanguin. La démonstration que de hauts niveaux d'expression du VEGF-A dans les cancers des poumons étaient associés à un mauvais pronostic (Yuan et al., 2011) a conduit à l'hypothèse que ces traitements ciblant la voie du VEGF-A pourraient amener un bénéfice considérable dans le traitement des patients atteints de CBnPCs (Ferrara et al., 2004). En accord avec un rôle important du VEGF-A dans la progression tumorale des CBnPCs, une étude portant sur 1816 patients porteurs de CBnPCs, mais aussi de carcinomes colorectaux ou rénaux a fait la preuve d'une association entre de hauts niveaux circulants de VEGF-A et une survie sans progression ou survie totale diminuée,

confirmant le rôle du VEGF-A comme marqueur de mauvais pronostic (Hegde et al., 2013). De façon importante, dans cette étude aucune corrélation entre les niveaux de VEGF-A sécrétés et intra-tumoraux n'a été retrouvée suggérant aussi la nécessité d'envisager les 2 pools de VEGF-A de façon distincte.

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs agents ciblant la voie VEGF/VEGFR ont été approuvés par la FDA ou sont en cours d'essais cliniques. Ces agents agissent suivant deux stratégies principales (figure 23). La première consiste à piéger le ligand VEGF-A et à empêcher son interaction avec ces récepteurs et/ou corécepteurs. La deuxième stratégie vise à inhiber l'activation des récepteurs, soit en bloquant le site de fixation du VEGF-A sur ces derniers, soit en inhibant leur activité tyrosine kinase. Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, la majorité des vaisseaux présents au sein de la tumeur ne sont pas recouverts par les péricytes comme les vaisseaux normaux. Ils sont immatures, tortueux et présentent une augmentation de leur perméabilité. Ils sont donc très dépendants des facteurs de croissance, comme le VEGF-A, pour survivre et se développer et donc potentiellement très sensibles aux thérapies bloquant la voie VEGF-A. A l'inverse, les vaisseaux tumoraux présents à la périphérie des tumeurs sont recouverts par des péricytes, donc plus matures et moins dépendants du VEGF-A, et seraient moins sensibles aux thérapies. Le concept général qui a été proposé est donc celui d'une « normalisation des vaisseaux », via la sélection des vaisseaux tumoraux les plus matures et fonctionnels en réponse aux traitements anti-angiogéniques (Jain, 2005). Cette « normalisation » entraînerait une augmentation transitoire de la perfusion de la tumeur qui pourrait favoriser la délivrance des chimiothérapies co-administrées avec ces traitements ou l'effet de la radiothérapie. D'ailleurs, les thérapies bloquant le ligand sont le plus souvent utilisées en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie alors que les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase sont utilisés le plus souvent en monothérapie (Moserle et al., 2014).

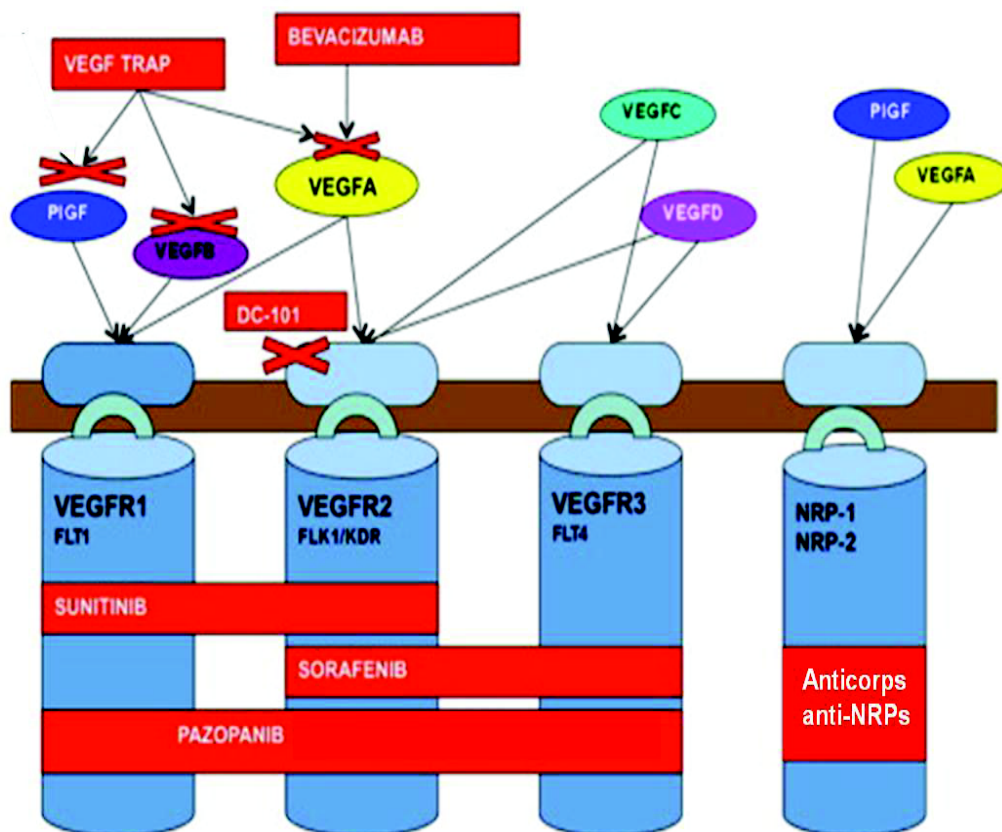


Figure 23. Vue générale des mécanismes d'action des agents anti-angiogéniques. Les principales stratégies anti-angiogéniques consistent soit à cibler le ligand VEGF-A afin d'inhiber sa fixation à ses récepteurs (Bevacizumab, VEGF-trap), soit à inhiber l'activation des récepteurs par des agents agonistes (DC-101) qui bloquent les site de fixation du VEGF sur son récepteur, ou des agents ciblant l'activité tyrosine kinase de ces derniers (Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib). Plus récemment, des études impliquant les corécepteurs dans le développement tumoral ont conduit au développement d'agents ciblant les corécepteurs tel que des anticorps anti-NRP1. (d'après Azam et al., 2010).

III.2. Les différentes thérapies anti-angiogéniques

III.2.1. Thérapies ciblant les ligands

Les premiers agents anti-angiogéniques à avoir été développés, dit de première génération, sont des inhibiteurs à cible unique visant à inhiber la signalisation VEGF/VEGFRs. Leur principal effet consiste à capter le VEGF sécrété afin de l'empêcher d'exercer son effet sur les cellules endothéliales. Le chef de file de ces agents est le **Bevacizumab** (BVZ, Avastin®, Genentech). Cet agent est un anticorps monoclonal recombinant humanisé qui est capable de lier spécifiquement le VEGF-A avec une très grande affinité l'empêchant ainsi d'interagir avec ses récepteurs (VEGFRs). Cet anticorps comprend la structure consensus IgG1 humaine, des régions de liaison à l'antigène (93%) et 6 régions provenant d'un anticorps monoclonal murin (7%). Le BVZ est caractérisé par une clearance assez lente et une longue demi-vie d'environ 20 jours (Ferrara et al., 2004). Ces propriétés pharmacocinétiques permettent aux cliniciens de maintenir des doses efficaces de BVZ pendant deux à trois semaines et de coordonner l'administration de cet agent avec celle des chimiothérapies qui y sont associées (Lu et al., 2008). De façon importante, il semble que la durée du traitement par BVZ est un paramètre important conditionnant la réponse tumorale. Ainsi, des études précliniques chez la souris ont montré que seulement 7 jours après l'arrêt du traitement, la vascularisation tumorale était rétablie alors qu'un traitement prolongé empêche cet effet (Mancuso and Sternberg, 2006). Des études cliniques ont aussi montré une perte des bénéfices sur la survie sans progression à l'arrêt du traitement (Sandler et al., 2006 ; Mountzios et al., 2014). Cependant, une utilisation pendant une longue période de BVZ pourrait être problématique puisqu'il semblerait que l'administration de cet agent soit aussi à l'origine de l'apparition de divers effets secondaires (Tableau 3). Le plus couramment observé de ces effets est une hypertension artérielle due à l'augmentation de la production d'oxyde nitrique causée par l'inhibition du VEGF qui induit la constriction des vaisseaux et une baisse de sodium dans les urines (van Heeckeren et al., 2007). De plus, en 2011, une méta-analyse s'appuyant sur les résultats de 16 études cliniques a montré une augmentation du risque de survenue d'évènements entraînant la mort (FAE, *Fatal Adverse Event*) chez les patients traités au BVZ par rapport à la chimiothérapie utilisée seule (Ranpura et al., 2011). Ces études indiquent la nécessité de sélectionner les patients susceptibles de pouvoir bénéficier de cette thérapie.

Toxicité	Détails	Prise en charge
Hypertension	22-32% Risques dose-dépendants	Traitements anti-hypertenseurs Arrêt du traitement pour les cas réfractaires ou en cas de crise hypertensive
Protéinurie	Incidence 21-63% Risques dose-dépendants	Discontinuité du traitement BVZ. Arrêt si la protéinurie > 2 g/24 h. Reprise lorsque la protéinurie < 2 g/24 h
Hémorragies	Incidence 30.4% Plus fréquemment des épistaxis Incidence des saignements plus importants (hémoptysie, hémorragie gastro-intestinale, hémorragie intracrânienne, hémorragie intratumorale): 2,8%	Premiers soins habituels pour les saignements mineurs
Problèmes de cicatrisation	Incidence de 13% chez les patients opérés pendant leur traitement au BVZ	Retarder le traitement par BVZ jusqu'à > 28 jours après la chirurgie
Thromboembolisme	Incidence 11%	
Perforations Gastro-intestinales	Incidence 0.9% Mortalité 21.7% Risques variables selon les doses et types de cancers	Discontinuité du traitement BVZ. Intervention chirurgicale

Tableau 3 : Les toxicités associées au traitement par BVZ. (D'après Wu and Staton, 2012)

Malgré ces effets secondaires, le BVZ est le premier agent anti-angiogénique à avoir démontré un bénéfice clinique en traitement de première ligne dans les cancers colorectaux métastatiques, les cancers mammaires métastatiques, les cancers rénaux métastatiques, les cancers ovariens épithéliaux métastatiques et les cancers pulmonaires non-squameux et en seconde ligne de traitement dans les glioblastomes (Mountzios et al., 2014; Burger et al., 2011; Escudier et al., 2007; Friedman et al., 2009; Herbst et al., 2007; Hurwitz, 2004).

Les premiers résultats attestant de l'efficacité de BVZ dans le traitement des CBnPCs ont été ceux d'une étude randomisée en phase II publiés en 2004 par Johnson et collaborateurs qui ont montré que l'intégration de BVZ à une combinaison chimiothérapeutique basée sur le couple carboplatine-paclitaxel améliore de manière significative le taux réponse qui passe de 18.8% à 31.5% et la survie sans progression qui passe de 4.2 mois à 7.5 mois comparé à des patients à des stades avancés de CBnPCs traités uniquement avec des chimiothérapies. Cette étude n'a montré aucun bénéfice sur la survie globale des patients. Cette étude a aussi montré un important risque d'hémoptysie et d'hémorragie pulmonaire fatale chez les patients atteints de carcinomes pulmonaires squameux. Par la suite, les résultats d'une étude en phase III (E4599) conduite par l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), et visant à évaluer les effets du couple carboplatine-paclitaxel avec ou sans BVZ, a montré une amélioration significative liée au BVZ du taux de réponse (35% vs 15%), de la survie sans progression (6.2 vs 4.5 mois) et de la survie globale (12.3 vs 10.3 mois) . En se basant sur ces données (Sandler et al., 2006; Sandler, 2006), La FDA a accordé son autorisation pour l'usage du BVZ dans le traitement des CBnPC avancés de type histologique non squameux en 2006. Une seconde étude randomisée en phase III (AVAIL) a comparé les effets du couple cisplatine-gemcitabine avec ou sans BVZ (7.5 mg/kg et 15 mg/kg) chez des patients atteints de CBnPCs à des stades avancés. Cette étude a démontré une amélioration moins importante mais significative de la survie sans progression (6.7 et 6.5 vs 6.1 mois) et du taux objectif de réponse (37.8% et 34.6% vs 21.6%), mais sans aucun effet sur la survie globale (13.6 et 13.4 vs 13.1 mois) (Reck et al., 2010, 2009). En 2011, une méta-analyse a analysé plus précisément le bénéfice-risque entraîné par l'utilisation du BVZ en combinaison avec un traitement chimiothérapeutique à base de sels de platine dans le traitement des CBnPC avancés (Lima et al., 2011) . Selon cette étude, l'addition de BVZ à un traitement chimiothérapeutique impactait de manière plus significative sur la survie sans progression, avec un bénéfice de 1.4 mois par rapport à la médiane, ainsi que sur le taux de réponse qui démontrait une amélioration absolue de 16%. Cette étude a donc montré une amélioration significative mais néanmoins minime liée à l'utilisation de BVZ en combinaison avec des sels de platine en première ligne de traitement chez les patients atteints de CBnPC avancés. Des études de phase III ont aussi récemment été publiées concernant le bénéfice en traitement de maintenance du BVZ utilisé seul ou en association. Dans l'étude AVAPERL (MO22089), les auteurs ont comparé l'efficacité d'un traitement de maintenance combinant BVZ seul ou Bevacizumab et pemetrexed chez des patients ayant déjà reçu un traitement à base de

Bevacizumab, cisplatine et pemetrexed. Ils montrent un effet bénéfique de l'association Bevacizumab et pemetrexed comparativement au BVZ seul sur la survie sans progression (7,4 versus 3,7 mois) (Barlesi et al., 2013). De la même façon, l'étude de phase III PointBreak a comparé l'effet d'un traitement de maintenance combinant pemetrexed, carboplatine et BVZ ou paclitaxel, carboplatine et Bevacizumab mais n'a pas démontré d'effet sur la survie globale entre les 2 traitements (Patel et al., 2013). L'étude de phase IIIb ATLAS a comparé l'association BVZ et erlotinib ou BVZ seul en maintenance chez des patients ayant reçu une chimiothérapie mais n'a pas démontré de réel effet bénéfique de cette association (Johnson et al., 2013). Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'action du BVZ en combinaison avec des traitements chimiothérapeutiques (Tableau 4 et Figure 24). L'une des possibilités est l'action synergique du BVZ avec ces agents. Même s'il n'y a pour l'instant aucune preuve clinique de l'existence d'une telle synergie, des arguments issus de travaux précliniques (Bagri et al., 2010) permettent d'assumer que la baisse du taux de VEGF-A induite par l'utilisation d'anticorps anti-VEGF sensibiliserait les cellules endothéliales aux effets pro-apoptotiques induits par les agents chimiothérapeutiques. Comme décrit précédemment, une autre théorie postule que l'inhibition du VEGF-A induit la normalisation et la stabilisation des néovaisseaux tumoraux, facilitant l'acheminement des agents chimiothérapeutiques jusqu'à la tumeur (Carmeliet and Jain, 2011). Néanmoins, une étude récente a démontré par tomographie par émission de positons, qu'à l'inverse, le traitement par BVZ diminue la quantité d'agent chimiothérapeutique ([¹¹C]docetaxel) acheminé jusqu'aux tumeurs chez des patients en stades avancés de CBnPC (Van der Veldt et al., 2012). Cela pourrait être l'une des raisons expliquant le faible bénéfice observé suite à la combinaison de ces thérapies dans le traitement des CBnPC en contraste avec ceux obtenus dans les cancers colorectaux (Willett et al., 2004) et dans les glioblastomes (Batchelor et al., 2007). La possibilité de l'utilisation d'agents anti-angiogéniques en tant que traitements adjuvants chez des patients qui n'ont pas été préalablement traités a aussi été envisagée. Cependant, les résultats des études menées sur l'utilisation de BVZ en combinaison avec les chimiothérapies adjuvantes ont été très décevants dans le cas des cancers colorectaux (Allegra et al., 2013; de Gramont et al., 2012) et des cancers mammaires triple négatifs (Cameron et al., 2013).

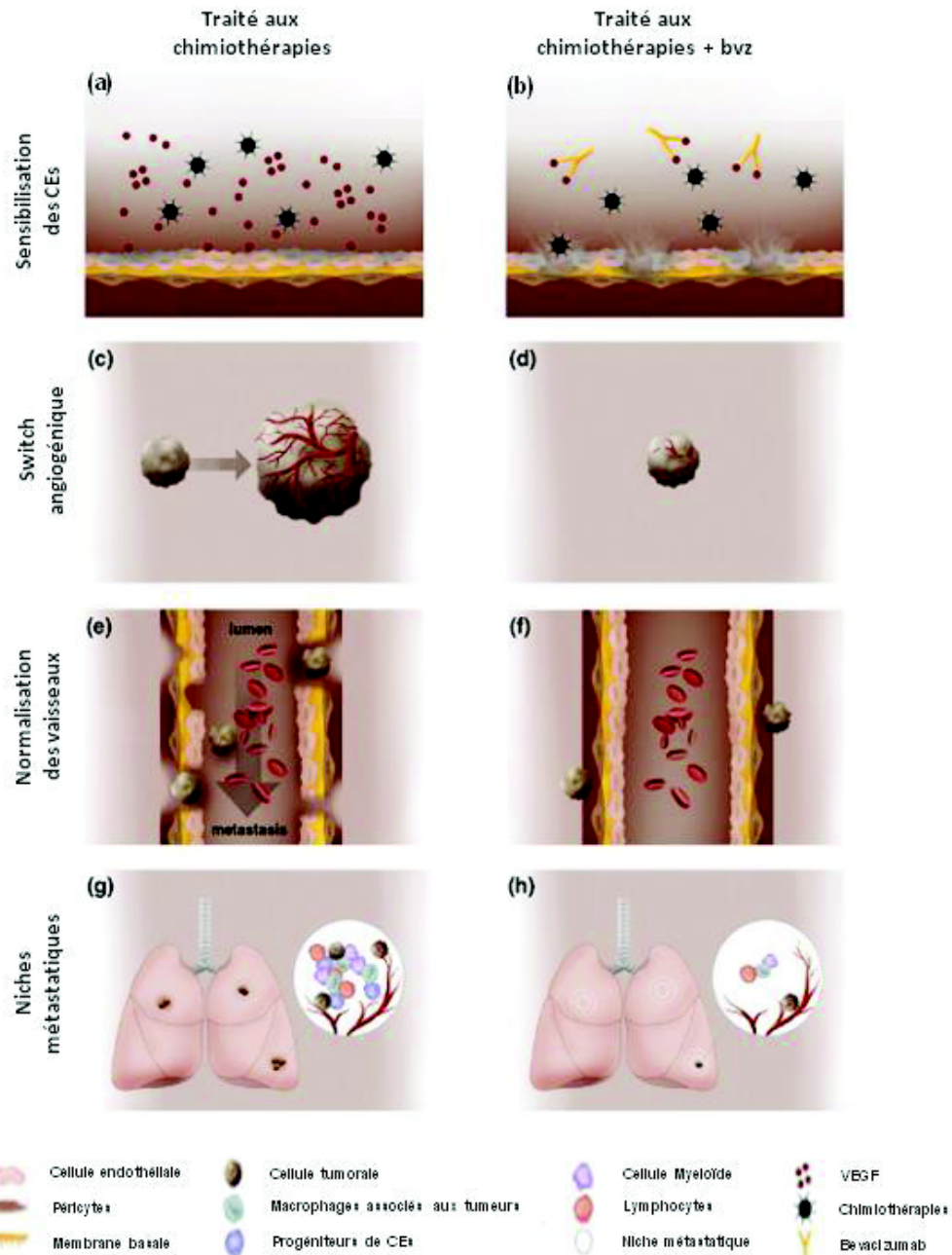


Figure 24. Mécanismes d'action proposés pour le Bevacuzimab. (a) Sensibilisation vasculaire : VEGF-A agit comme un facteur de survie pour les CEs. Son épuisement par le BVZ peut sensibiliser les CEs aux effets cytotoxiques de la chimiothérapie. (b) Switch angiogénique : les tumeurs recrutent des vaisseaux pour permettre une croissance exponentielle. Le VEGF-A est essentiel pour déclencher ce processus. Le BVZ peut exercer ses effets cytostatiques en bloquant le VEGF-A ce qui retarde ou empêche la croissance de ces lésions micrométastatiques en inhibant le recrutement des vaisseaux sanguins. (c) Ralentissement du processus métastatique : le BVZ favorise la normalisation des vaisseaux parcourus de fuites. Les jonctions cellulaires se referment et la couche de péricytes est restaurée, empêchant l'évasion et la diffusion des cellules tumorales. (d) Le contrôle de la niche métastatique : le VEGF-A impacte sur la composition de l'infiltrat immunitaire dans la niche métastatique favorisant ainsi le développement tumoral. Avec la suppression continue de VEGF-A, le bevacizumab peut affecter la survie et la maturation des cellules immunitaires non différenciées dans la niche et empêcher la reprise de la croissance tumorale. (D'après Bagri et al. 2010)

Aflibercept (Sanofi-Aventis et Regeneron Pharmaceuticals) est une molécule de fusion composée d'un segment extracellulaire VEGFR1 et VEGFR2 fusionné avec la région constante Fc d'IgG1 humaine (Tableau 4). Elle agit donc comme un récepteur leurre qui empêche le ligand de se fixer à ses récepteurs. Cependant, cet agent a un spectre d'action plus large que le BVZ car il cible aussi bien le VEGF-A que les VEGF-B et PlGF. Dans des études randomisées, Aflibercept utilisée en combinaison avec la chimiothérapie de référence augmente la survie globale et la survie sans progression dans les cancers colorectaux (Van Cutsem et al., 2012b). A l'inverse, dans les CBnPCs résistants aux sels de platine et à l'erlotinib, cet agent utilisé seul n'a démontré aucun bénéfice clinique (Ramlau et al., 2012). Des essais en phase II seraient en cours pour évaluer les effets d'Aflibercept en combinaison ou non avec Topotecan dans les cancers pulmonaires à petites cellules (Zhang and He, 2013).

III.2.2. Thérapies ciblant les récepteurs VEGFR

La petite taille et l'hydrophobie des molécules destinées à inhiber l'activité tyrosine kinase des récepteurs les rendent capables de diffuser librement à travers la membrane plasmique afin d'interagir directement sur le domaine intracellulaire des récepteurs (Tableau 4). Le domaine tyrosine kinase est doté d'une structure bi-lobaire avec un site de fixation de l'ATP localisé entre le lobe N-terminal et le lobe C-terminal. Sur ce dernier, se trouve une boucle d'activation contenant une séquence d'acide aminés (Asp, Phe, Gly) appelée motif DFG. Lorsque cette boucle d'activation est en conformation inactive (conformation dite DFG-out), elle forme une poche hydrophobe autour du site de fixation de l'ATP. Lorsque les TKI se fixent à cette poche, la boucle d'activation n'est plus capable de se mettre en conformation active (DFG-in), empêchant l'activation des récepteurs et la signalisation (Limaverde-Sousa et al., 2014). Selon leur mode d'action les TKI sont classés en trois principales catégories. Les TKI de classe I, représentés par le Sunitinib, forment des liaisons avec le domaine intracellulaire des récepteurs à proximité du site de liaison de l'ATP et miment l'interaction de l'ATP avec l'enzyme. Les TKI de classe II, comme Sorafenib, se lient à la poche hydrophobe qui se forme lorsque la boucle d'activation des récepteurs est en conformation DFG-out. Cette interaction inhibe la signalisation en empêchant le passage de la conformation DFG-out à DFG-in. La classe III des TKI, est représentée par des molécules qui forment des liaisons covalentes avec le domaine tyrosine kinase. Ces inhibiteurs sont donc dits « irréversibles », Vandetanib en est un parfait exemple. Ces inhibiteurs pharmacologiques

bloquent l'activité tyrosine kinase de multiples récepteurs. Le vandetanib bloque l'EGFR, les VEGFR-1, -2 et -3 et la kinase RET. Le sunitinib (Sutent), le sorafenib (Nexavar) et le cediranib (Recentin) bloquent l'activité des VEGFR-1, -2, -3 aussi bien que des PDGFR, RET et c-Kit. En clinique, les agents anti-VEGF ne montrent de bénéfices que lorsqu'ils sont combinés à des chimiothérapies ou associés à un traitement radiothérapeutique. A l'inverse les agents ciblant l'activité tyrosine kinase des VEGFRs (TKI) sont administrés en monothérapie (Escudier et al., 2007; Motzer et al., 2007). L'utilisation clinique des VEGFRs TKI en monothérapie a montré des résultats encourageant dans le traitement des cancers rénaux à cellules claires et des carcinomes hépatocellulaires. Cependant, les effets de ces traitements se sont avérés décevants dans le traitement d'autres types de cancers (Moserle et al., 2014). Dans les CBnPCs, une étude de phase III (ZODIAC) comparant les effets de l'association docetaxel seul versus docetaxel associé au vandetanib en seconde ligne de traitement n'a pas démontré de bénéfice clair sur la survie globale ou sans progression (Korpany et al., 2011). Des essais de phase III sont actuellement en cours pour tester les effets de la combinaison vandetanib, carboplatine et paclitaxel en thérapie néoadjuvante ou vandetanib et pemetrexed. Les résultats des essais cliniques de phase II et III (ESCAPE, E2501) utilisant les agents multi-cibles (sunitinib, sorafenib ou cediranib) sont pour le moment décevants en terme de réponse globale dans les CBnPCs,. Des essais testant des molécules plus spécifiques des VEGFR telles que pazopanib, axitinib, motesanib sont en cours.

III.2.3. Les inhibiteurs peptidiques de l'angiogenèse

Les toxicités induites par les traitements TKI et anti-VEGF, ainsi que l'apparition de résistance à ces traitements ont soulevé des inquiétudes quant à leur bénéfice réel. La recherche s'est donc aussi dirigée vers d'autres agents anti-angiogéniques susceptibles de présenter moins d'effets toxiques que les inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFRs. Dans ce contexte, la possibilité d'utiliser des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse en tant que traitements anti-tumoraux a été étudiée (Tableau 4).

L'angiostatine est un fragment de 38 kDa issu du plasminogène. Au niveau de la membrane cellulaire, l'angiostatine possède plusieurs partenaires potentiels à travers lesquels elle peut

exercer une activité anti-angiogénique importante. « *In vitro* », sa liaison avec l'ATP synthétase, la chondroïtine sulfate proteoglycane NG2, l'angiomotine, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, c-met ou l'annexine II, serait capable d'induire l'apoptose dans les cellules endothéliales, d'inhiber leur migration et la tubulogénèse (Limaverde-Sousa et al., 2014). Dans une étude en phase II, l'angiostatine en combinaison avec le paclitaxel et le carboplatine a montré un taux de contrôle élevé de la maladie chez les patients atteints CBnPC avancé (Kurup et al., 2006).

Un autre agent peptidique à propriétés anti-angiogéniques est l'endostatine. Même si les mécanismes d'action impliqués dans ses effets n'ont pas été totalement clarifiés, ce fragment de 20 kDa provenant du domaine C-terminal du Collagène XVIII serait capable non seulement de bloquer l'activité du VEGF et du FGF en affectant ainsi la survie et la prolifération des cellules endothéliales, mais aussi de réguler l'expression de répresseurs de l'angiogénèse (Abdollahi et al., 2004). Malgré le bénéfice qu'a démontré l'endostatine au cours d'essais de phase I et II (Eder et al., 2002; Hansma et al., 2005; Kulke et al., 2006), ces résultats ont été jugés insuffisants par rapport à ceux obtenus avec BVZ et les TKI. Par la suite, les travaux sur l'endostatine ont été poursuivis de manière plus poussée en Chine où cet agent a été approuvé la SFDA chinoise en 2005 dans le traitement des CBnPCs en combinaison avec les chimiothérapies (Folkman, 2006).

SPECTRE	AGENT	CIBLE	TYPE DE CANCER	PHASE
Cible unique	Bevacizumab	VEGF-A	Colon métastatique CBnPC non-squameux GM	Approuvé (US/EU) Approuvé (US/EU)
	Cetuximab	EGFR	CCR métastatique Carcinome squameux TEC Cancer colorectaux	Approuvé (US/EU) Approuvé (US/EU)
	Panitumumab	EGFR	Colon métastatique	Approuvé (US/EU)
	Trastuzumab	HER-2	Cancers mammaires et gastriques surexprimant HER2	Approuvé (US/EU)
	Pertuzumab	HER2	Cancers mammaires métastatiques surexprimant HER2	Approuvé (US/EU)
Plusieurs cibles	Aflibercept	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Colon métastatique	Approuvé (US)
	Axitinib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 PDGFR KIT	CCR avancé	Approuvé (US/EU)
	Cedratinib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 PDGFR KIT	Colon métastatique, GBM récurrent, Cancer ovarien, Cancer pulmonaire	Phase III
	Indetanib	VEGFR, PDGFR, FGFR	CBnPC Cancer ovarien	Phase III
	Pazopanib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, KIT	CCR avancé Sarcome des tissus mous avancé	Approuvé (US/EU)
	Sorafenib	VEGFR2 VEGFR3 PDGFR Raf KIT	Carciomes hépatocellulaires CCR avancé	Approuvé (US/EU)
	Sunitinib	VEGFR1 VEGFR2	Tumeur stromale gastrointestinale CCR avancé	Approuvé (US/EU)

	Vandetanib	VEGFR3	Tumeurpancréatique neuroendocrine	
		PDGFR		
		FLT3		
		CSF-1R		
		RET		
		VEGFR2, EGFR , KIT, RET	Cancer médullaire de la thyroïde	Approuvé (US/EU)
	Vatalanib	VEGFR1 VEGFR2 VEGFR3 PDGFR	Cancers colorectaux	Phase III
Large spectre	ABT-510	CD-36	Cancer TEC, Mélanomes, Lymphomes, CCR Sarcome des tissus mous CBnPC	Phase II
	ATN-161	Intégriness $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$	Tumeurs du cerveau et du système nerveux central CCR	Phase II
	Angiostatine	ATP synthase NG2 Angiomotine Intégriness $\alpha_v\beta_3$ c-met annexin II	Gliomes GBM	Phase II
	Endostatine	Intégriness $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, Nucleoline Caveoline-1 MMP-2 VEGFR2 Glypicanes 1- 4	CBnPC Cancers mammaires	Approuvé en Chine Phase III/IV
	Lenalidomide	CRBN	Myélome multiple	Approuvé (US/EU)
	Thalidomide	CRBN	Myélome multiple	Approuvé (US/EU)

Tableau 4. Différentes catégories d'agents anti-angiogéniques approuvés ou en essais cliniques.

(D'après Limaverde-Sousa et al., 2014)

III.2.4. Thérapies ciblant les corécepteurs

L'implication des NRPs dans le processus oncogénique en fait une cible thérapeutique de choix, et des agents ciblant ces corécepteurs ont commencé à voir le jour. Deux stratégies principales d'agents ciblant les NRPs ont été développées. A l'heure actuelle, les efforts se sont principalement concentrés sur la génération d'agents capables de bloquer l'interaction entre les NRPs et la région codée par les exons 7 et 8 du VEGF-A et donc la signalisation induite par cette interaction. C'est dans ce but que des anticorps monoclonaux ont été développés (Bumbaca et al., 2012), l'idée étant que l'association d'anticorps bloquant l'interaction VEGF-A/NRP avec un anticorps anti-VEGF pourrait être bénéfique puisque le BVZ bloque l'interaction du VEGF-A avec ces récepteurs mais pas son interaction avec les NRPs. En accord avec cette hypothèse, des études précliniques chez la souris ont montré que le blocage de la NRP1 potentialise l'effet inhibiteur sur la croissance tumorale du BVZ (Pan et al., 2007). De plus, des études cliniques chez des patients atteints de cancers avancés de l'estomac et du sein ont corrélé de hauts niveaux tumoraux de NRP1 à une moins bonne réponse au BVZ (Jubb et al., 2011; Van Cutsem et al., 2012b), indiquant qu'une combinaison BVZ et anti-NRP1 pourrait être bénéfique chez ces patients. Malheureusement, les résultats d'un essai de phase I publiés très récemment et utilisant un anticorps monoclonal humanisé anti-NRP1, le MNRP1685A, soulèvent des questions concernant l'utilisation en clinique de cet anticorps. Ainsi, les auteurs montrent que les patients traités par une association BVZ et MNRP1685A présentent avec une fréquence élevée une thrombopénie et une protéinurie (Patnaik et al., 2014). Même si les efforts se sont portés le plus souvent sur l'inhibition de l'activité de la NRP1, il a aussi été démontré qu'un anticorps anti-NRP2 avait un effet anti-métastatique (Caunt et al., 2008). Cependant, les résultats pourraient dépendre du type tumoral puisque l'inhibition de la NRP2 dans les cellules de cancer de la prostate induit l'expression de l'IGF1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) et active une cascade de signalisation conduisant à la prolifération tumorale (Goel et al., 2012).

La deuxième famille d'agents ciblant les NRPs est représentée par des peptides. Les peptides présentant la séquence C-terminale consensus R/KXXR/K interagissent avec les domaines b1/b2 de la NRP1 et bloquent l'interaction du VEGF₁₆₅ et des sémaphorines. Un peptidomimétique résistant à la protéolyse et ciblant la NRP1 et le VEGFR1 a été développé. Ce peptide, appelé D(LPR) , a démontré une activité anti-angiogénique « *in vivo* » et « *in vitro* » (Giordano et al., 2010). Les peptides qui se lient au domaine extracellulaire des NRPs

présentent un grand intérêt grâce à leur capacité à être internalisés via leur liaison à ces corécepteurs. Cette capacité à pénétrer dans les tumeurs par endocytose permet de les coupler à d'autres agents thérapeutiques pour améliorer leur efficacité, ou à les coupler à des agents permettant d'améliorer la visualisation des tumeurs en imagerie médicale (Sugahara et al., 2010). Par ailleurs, un agent non peptidique, l'EG00229, augmente l'activité cytotoxique de certaines chimiothérapies. Cela démontre que les agents ciblant les NRPs permettent non seulement de potentialiser l'effet de certaines thérapies anti-angiogéniques ou d'agents chimiothérapeutiques, mais possèdent eux même des propriétés anti-tumorales.

III.2.5. Thérapies ciblant les différents récepteurs à activité tyrosine kinase

En prenant en compte la grande hétérogénéité des CBnPC, la multitude de voies qui interviennent dans leur développement et l'existence de « cross-talk » entre ces différentes voies, le fait de combiner différentes thérapies ciblées pour agir sur plusieurs récepteurs à la fois pourrait s'avérer intéressant pour le traitement des CBnPC. Dans ce contexte, la combinaison la plus étudiée est celle de l'inhibition des voies de signalisation dépendantes du VEGF et de l'EGFR. La pertinence de telles études est soutenue par l'existence de « cross-talk » entre EGFR/VEGFR dans les tumeurs (Larsen et al., 2011). Les premiers résultats issus d'une évaluation en phase II de la combinaison BVZ et erlotinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, ont donné des résultats encourageant en traitement de seconde ligne des patients atteints de CBnPC réfractaires, en comparaison avec les traitements chimiothérapeutiques conventionnels (Herbst et al., 2007). Ces résultats n'ont malheureusement pas été confirmés par les études en phase III qui ont fait suite, dans lesquelles aucun bénéfice n'a été observé suite au traitement BVZ-erlotinib en comparaison au traitement par erlotinib (Herbst et al., 2007). Cependant, des études précliniques ont montré que la combinaison d'agents inhibiteurs de l'activité des VEGFRs combiné à des inhibiteurs de l'EGFR pourrait présenter un intérêt dans le traitement des tumeurs colorectales (Poindessous et al., 2011). Plus récemment, une autre évaluation en phase III de la combinaison BVZ-erlotinib, chez des patients atteints de CBnPC avancés a montré une amélioration de la survie sans progression mais pas de la survie globale (Johnson et al., 2013). D'autres études s'avèrent donc nécessaires pour déterminer le bénéfice réel de ces combinaisons ainsi que pour déterminer les toxicités additives qui pourraient en résulter.

III.2.6. Les agents désintégrant les vaisseaux VDA

Contrairement aux traitements anti-angiogéniques, les agents désintégrant les vaisseaux, dit VDA (*Vascular Disrupting Agent*), ne ciblent pas la formation de néo-vaisseaux au niveau du site tumoral, mais s'attaquent directement à la vasculature préexistante. Ces agents agissent en induisant l'occlusion des vaisseaux qui alimentent les tumeurs, causant une chute brutale du flux sanguin, une ischémie et une nécrose importante au centre même des tumeurs. Ces agents affectent l'organisation du cytosquelette et les jonctions cellules-cellules des cellules endothéliales, exposant ainsi la membrane basale au flux sanguin (Tozer et al., 2005). L'infiltration de protéines plasmatiques hors des vaisseaux cause une augmentation de la pression interstitielle dans les tissus environnants, ce qui induit rapidement une vasoconstriction des vaisseaux dans le site de l'œdème. L'exposition de la membrane basale au flux sanguin, induit l'activation d'une cascade de coagulation résultant en une thrombose (Wu et al., 2013).

Ces composés peuvent être subdivisés en flavonoïdes et en agents liants les microtubules. Récemment, plusieurs de ces agents ont été utilisés lors d'essais cliniques en combinaison avec des chimiothérapies, et ce dans différents types de cancers. Cependant, malgré les effets nécrotiques très rapides observés suite au traitement des tumeurs par ces agents, des cellules en périphérie des tumeurs persistent toujours (Tozer et al., 2008), sans doute parce que cette région est généralement mieux vascularisée. Ces mêmes cellules sont capables d'initier à nouveau le développement tumoral. Le traitement par les VDA sélectionnerait des cellules qui seraient plus agressives et plus adaptées à l'hypoxie. Cette adaptation aux conditions hypoxiques passerait notamment par une augmentation de l'expression de facteurs associés à l'angiogenèse comme HIF1 α (Dachs et al., 2006; Tozer et al., 2008). De ce fait, la combinaison de ces agents avec des inhibiteurs de HIF1 α pourrait présenter un grand intérêt pour contourner les résistances induites par ces agents. Cependant, et comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, les mécanismes de résistance mis en place par les tumeurs sont très complexes. Ainsi, en plus d'une compensation via la production de facteurs pro-angiogéniques, d'autres études démontrent une participation des autres types cellulaires associés aux tumeurs, notamment les macrophages et des progéniteurs endothéliaux, qui favoriseraient une revascularisation des tumeurs (Welford et al., 2011; Wu et al., 2013). Tous ces facteurs rendent l'efficacité des agents désintégrant les vaisseaux utilisés en

monothérapies extrêmement limitée. Afin de potentialiser les effets de ces composés, une combinaison avec les agents anti-angiogéniques a été envisagée. Il est très probable qu'une telle combinaison résulte en un effet synergique sur la croissance des tumeurs et pourrait aussi minimiser l'apparition des résistances qui émergent suite au traitement par l'une ou l'autre des thérapies. Des études précliniques ont montré qu'une telle combinaison améliorerait la réponse de xénogreffes au traitement (Rossi et al., 2009; Siemann and Shi, 2008). Dans cette optique, les chimiothérapies pourraient aussi potentialiser les effets induits par les agents désintégrant les vaisseaux (Kim et al., 2007). Une clarification des modalités d'usage de telles combinaisons est donc essentielle.

III.3. Thérapies anti-angiogéniques : pourquoi ne fonctionnent-elles pas aussi bien qu'espéré ?

Comme nous venons de le voir, l'utilisation de traitements anti-angiogéniques est aujourd'hui devenue courante dans la pratique clinique pour traiter un large panel de tumeurs solides. Cependant, malgré les résultats précliniques encourageants, les résultats chez l'Homme sont décevants en ce qui concerne le bénéfice sur la survie des patients. De plus, certaines études ont mis en évidence une adaptation et un échappement à ces traitements voir même l'apparition d'un phénotype plus agressif après une exposition prolongée à ces agents anti-angiogéniques (Bagri et al., 2010; Ebos et al., 2009; Larrayoz et al., 2014; Paez-Ribes et al., 2009). Les mécanismes moléculaires sous-tendant ces effets demeurent largement méconnus et pourraient dépendre du type tumoral considéré ainsi que du type d'agent anti-angiogénique. De plus, une controverse existe encore entre les résultats des données précliniques obtenus chez la souris et les résultats obtenus chez l'Homme en ce qui concerne les effets délétères de certaines de ces thérapies (Blagoev et al., 2013). Les résultats décevants en clinique et ces controverses soulignent la nécessité de mieux comprendre comment les thérapies anti-angiogéniques agissent, mais aussi, de mieux caractériser les stratégies mises en place par les tumeurs pour leur échapper. L'objectif à terme est d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse qui permettront une meilleure sélection des patients à traiter et une augmentation de la balance bénéfice/risque.

Lors de leur développement, on a d'abord pensé que les thérapies anti-angiogéniques n'induiraient pas de résistances, comme celles observées suite aux traitements chimiothérapeutiques, car ces agents ciblent les cellules endothéliales qui sont génétiquement stables et non des cellules tumorales instables (Boehm et al., 1997). Par la suite, plusieurs études précliniques et cliniques ont montré que ce n'était pas le cas et que des résistances à ces thérapies ciblées apparaissent bel et bien. Il est important de distinguer la résistance intrinsèque (primaire) de la résistance acquise. Lorsque les tumeurs sont d'emblée réfractaires aux traitements anti-angiogéniques et qu'elles continuent de croître même en présence de ces agents, la résistance est considérée comme étant intrinsèque. Dans ce cas, les tumeurs ne seraient pas directement dépendantes de la néoangiogenèse tumorale pour leur croissance. Certains postulent que cela pourrait être lié à la préexistence d'un réseau vasculaire au site tumoral ou bien à la capacité des cellules tumorales à mimer les cellules endothéliales en formant elles mêmes leurs propres vaisseaux (Moserle et al., 2014). A l'inverse, les tumeurs peuvent présenter une phase initiale de réponse puis elles peuvent mettre en place des mécanismes d'adaptation pour faire face à des changements de leur microenvironnement ou à l'absence de la signalisation dépendante du VEGF-A. Ce processus, appelé résistance acquise, ne met pas en jeu des mutations ou des amplifications géniques, mais se traduit plutôt par l'activation de voies alternatives qui permettraient la poursuite du développement tumoral malgré l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR (Figure 25) (Moserle et al., 2014).

III.3.1. Activation de voies de signalisation alternatives

Suite au blocage de la voie de signalisation dépendante du VEGF-A, d'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques sont sécrétés et compensent cette inhibition entraînant un phénomène de rebond de l'angiogenèse et/ou de la lymphangiogenèse (figure 25 –A). Ainsi, en réponse au BVZ, alors que les taux circulants de VEGF-A total diminuent dans les carcinomes hépatocellulaires, les mélanomes ou les cancers ovariens, on observe une augmentation des taux plasmatiques de PlGF, VEGF-C, VEGF-D, bFGF, PDGF ou SDF1 dans les cancers colorectaux ou de bFGF dans les cancers du poumon (Lambrechts et al., 2013). Dans les glioblastomes, l'accumulation de FGF2, SDF-1 et PlGF corrèle avec la progression des tumeurs en réponse aux thérapies anti-VEGF-A (Batchelor et al., 2007). Dans un modèle murin de carcinome pancréatique neuroendocrine, le blocage de la voie VEGFR2 induit une sécrétion de bFGF, angiopoïétine-1 et éphrine-A1 qui réactive le processus

angiogénique et la croissance tumorale (Casanovas et al., 2005). Dans les cancers du poumon, une étude mesurant les niveaux plasmatiques de 31 facteurs de croissance en réponse au pazopanib a montré que la diminution des niveaux plasmatiques de sVEGFR2 et d'IL-4 en réponse au traitement était corrélée avec une diminution du volume tumoral (Nikolinakos et al., 2010). Une des stratégies pour réverser cette résistance pourrait donc être de cibler les voies activées de façon redondante. Cependant, une telle approche paraît difficile à mettre en place compte tenu du nombre de facteurs activés qui diffère selon le type tumoral considéré et le type de thérapies anti-angiogéniques utilisées.

III.3.2. Rôle de l'hypoxie et du microenvironnement tumoral

Certaines études expliquent la résistance aux thérapies anti-angiogéniques par un changement du microenvironnement tumoral vers un environnement plus hostile à la croissance tumorale, pauvre en vaisseaux et donc hypoxique et pauvre en nutriments. Ces conditions défavorables conduiraient à l'émergence de cellules plus résistantes aux thérapies et favoriseraient les métastases (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). Cette adaptation aux conditions hypoxiques mettrait en jeu, d'une part, la modification de certaines caractéristiques métaboliques de ces cellules afin de survivre dans des conditions pauvres en oxygène, et d'autre part, une augmentation de l'expression de certaines molécules pro-angiogéniques qui pourraient participer à un phénomène de revascularisation en agissant sur les cellules du microenvironnement tumoral (Carmeliet, 2005). En accord avec un rôle de l'hypoxie dans la résistance aux thérapies anti-angiogéniques, l'augmentation des niveaux d'expression de la protéine CA9 (*Carbonic Anhydrase 9*), une cible de HIF-1, et de HIF-2 α est associée à un mauvais pronostic en réponse au traitement par BVZ et Irinotecan dans les astrocytomes (Sathornsumetee et al., 2008). Un environnement hypoxique va aussi favoriser l'accumulation de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) (Gao et al., 2009), de cellules endothéliales progénitrices (Shaked et al., 2006), de macrophages (Condeelis and Pollard, 2006) ou de polynucléaires neutrophiles (Nozawa et al., 2006). Ces cellules vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques et favoriser le rebond angiogénique. Les fibroblastes du microenvironnement sont aussi impliqués dans la résistance. Ainsi, une sécrétion de PDGF-C par les fibroblastes associés aux tumeurs (CAF, Cancer Associated Fibroblasts) est observée dans les tumeurs résistantes au BVZ. De plus, dans un modèle de xénogreffes dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires, une variation de l'expression de gènes impliqués dans la

signalisation dépendante de l'EGFR et du FGFR est observée dans les fibroblastes du stroma mais pas dans les cellules tumorales, et est corrélée à l'acquisition d'une résistance au BVZ (Cascone et al., 2011). Ces résultats mettent donc en lumière un rôle important du microenvironnement tumoral dans l'échappement aux thérapies anti-angiogéniques.

II.3.3. Modulation de la maturation vasculaire et co-option

Les thérapies anti-angiogéniques conduisent à une normalisation de la vasculature avec des vaisseaux plus matures. Cette normalisation est bénéfique puisqu'elle permettrait un meilleur accès aux chimiothérapies. Cependant, dans les cancers du poumon, une diminution plutôt qu'une augmentation de la quantité de chimiothérapie intra-tumorale est observée cinq heures après l'administration de BVZ (Van der Veldt et al., 2012). Cette normalisation est aussi délétère car les vaisseaux qui persistent sont plus résistants aux thérapies anti-angiogéniques. A l'inverse, les tumeurs privées de néo-vaisseaux peuvent utiliser pour leur croissance les vaisseaux normaux préexistants à la périphérie tumorale. C'est le phénomène de co-option vasculaire décrit notamment dans les mélanomes (Döme et al., 2002). Ainsi, dans un modèle de xénogreffe dérivé de glioblastome, une augmentation de l'infiltration de la tumeur par des vaisseaux de l'hôte a été décrite après traitement anti-VEGF (Rubenstein et al., 2000). D'autres études ont aussi montré un effet des thérapies anti-angiogéniques sur les péricytes qui conditionnent la stabilité vasculaire (Bergers et al., 2003). Cet effet pourrait générer des vaisseaux moins stables et donc plus aptes à permettre l'extravasation des cellules tumorales à l'origine des métastases (Bergers and Hanahan, 2008). Finalement, l'emploi de molécules à spectre d'inhibition trop large telles que le Sunitinib pourrait, en prévenant la phosphorylation des résidus tyrosine sur certaines molécules contribuant au maintien des jonctions cellule-cellule, favoriser l'intra- et l'extravasation des cellules tumorales (Chung et al., 2012).

II.3.4. Acquisition d'un phénotype invasif par les cellules tumorales et sélection de cellules souches cancéreuses

Comme nous l'avons précédemment décrit, les récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et NRP1 sont exprimés de manière variable à la surface de certaines cellules tumorales comme les cancers pulmonaires, rénaux, mammaires, gliaux et les mélanomes (Gerber et al., 2002; Hicklin and

Ellis, 2005). L'échappement aux thérapies anti-angiogéniques pourrait donc aussi impliquer l'effet de ces traitements sur les cellules tumorales elles même. Dans ce contexte, une observation essentielle est que le BVZ n'inhibe pas l'interaction du VEGF-A avec les NRPs. Compte tenu de l'importance potentielle de la signalisation dépendante des NRPs dans la genèse de cellules souches cancéreuses (Beck et al., 2011) et dans la signalisation dépendante du VEGF au niveau des cellules tumorales, une possibilité est donc que les cellules tumorales échappent au blocage du VEGF-A en « suractivant » les voies dépendantes des neuropilines. En accord avec cette hypothèse, des études précliniques chez la souris ont montré qu'un anticorps bloquant l'interaction VEGF-A/NRP1 ralentit la croissance tumorale (Bagri et al., 2010) et démontré le bénéfice de la combinaison BVZ et anticorps anti-neuropiline1 sur la croissance tumorale (Pan et al., 2007). Cependant, l'impact des thérapies anti-angiogéniques sur l'expression et l'activation de voies de signalisation dépendantes des NRPs dans les cellules tumorales reste largement méconnu. Dans les cancers colorectaux, des études « *in vitro* » ont montré que les cellules traitées de façon chronique (3 mois) au BVZ acquièrent un phénotype invasif et migratoire qui corrèle avec l'accumulation de VEGF-A, PlGF, VEGFR1 et P-VEGFR1 (Fan et al., 2011). D'autres études précliniques chez la souris ont permis de montrer un effet des thérapies anti-angiogéniques dans la génération de cellules tumorales présentant un phénotype plus agressif. Ainsi, dans des modèles de xénogreffes dérivées de carcinomes du rein à cellules claires, le BVZ sélectionne des cellules tumorales présentant une diminution de l'expression d'une phosphatase impliquée dans le contrôle de l'activation de l'EGFR (Grepin et al., 2012). Dans les tumeurs pancréatiques neuroendocrines, le BVZ ou le sunitinib sélectionne des cellules tumorales dans lesquelles c-Met est hyper-activé et qui expriment certains marqueurs d'EMT à l'origine d'un phénotype plus invasif (Carbone and Yang, 2012; Sennino et al., 2012). Dans les glioblastome, la voie c-Met est aussi impliquée dans l'échappement au BVZ via l'activation d'une cascade de signalisation impliquant la kinase FAK et STAT3 (Jahangiri et al., 2014; McCarty, 2013). De façon intéressante, chez les patients porteurs de glioblastome et résistants au BVZ, une accumulation au niveau ARN et protéique de l'intégrine $\beta 1$ a aussi été retrouvée (Carbonell et al., 2013). L'ensemble de ces études démontrent donc bien l'impact des thérapies anti-angiogéniques sur les cellules tumorales. Il est important de noter que l'impact sur les cellules tumorales des combinaisons utilisées en clinique telles que l'association BVZ/chimiothérapies demeure largement méconnu. De plus, il est probable que l'impact de ces thérapies sur les cellules tumorales va

dépendre de la présence conjointe ou non à la surface de ces cellules des différents récepteurs, puisque les signalisations activées en aval seront largement différentes.

Un autre mécanisme touchant la cellule tumorale et impliqué dans l'échappement aux thérapies anti-angiogéniques est la théorie selon laquelle les traitements prolongés par ces traitements généreraient l'apparition de souches cellulaires néoplasiques qui seraient plus tolérantes à l'hypoxie induite par ces agents. Cette théorie est soutenue par des résultats obtenus sur des modèles de xénogreffes de cancers mammaires. Ces résultats démontrent l'apparition, suite au traitement de ces xénogreffes par des agents anti-angiogéniques, d'une sous-population de cellules capables d'initier des tumeurs lorsque réimplantées chez d'autres animaux. Cette sous-population est caractérisée par de hauts niveaux d'aldéhyde déshydrogénase (Conley et al., 2012). En accord, dans un modèle de carcinome pulmonaire squameux murin échappant au traitement, il a été récemment montré que le sunitinib ou un anticorps anti-VEGFR2 induit l'apparition de cellules cancéreuses exprimant les marqueurs de cellules souches CD133, CD15 et ALDH1A1 (Larrayoz et al., 2014). Finalement, les cellules tumorales en dormance pourraient aussi être sélectionnées et contribuer à un phénotype plus agressif en devenant résistantes à la chimiothérapie et en favorisant la récurrence après l'arrêt du traitement (Naumov et al., 2003).

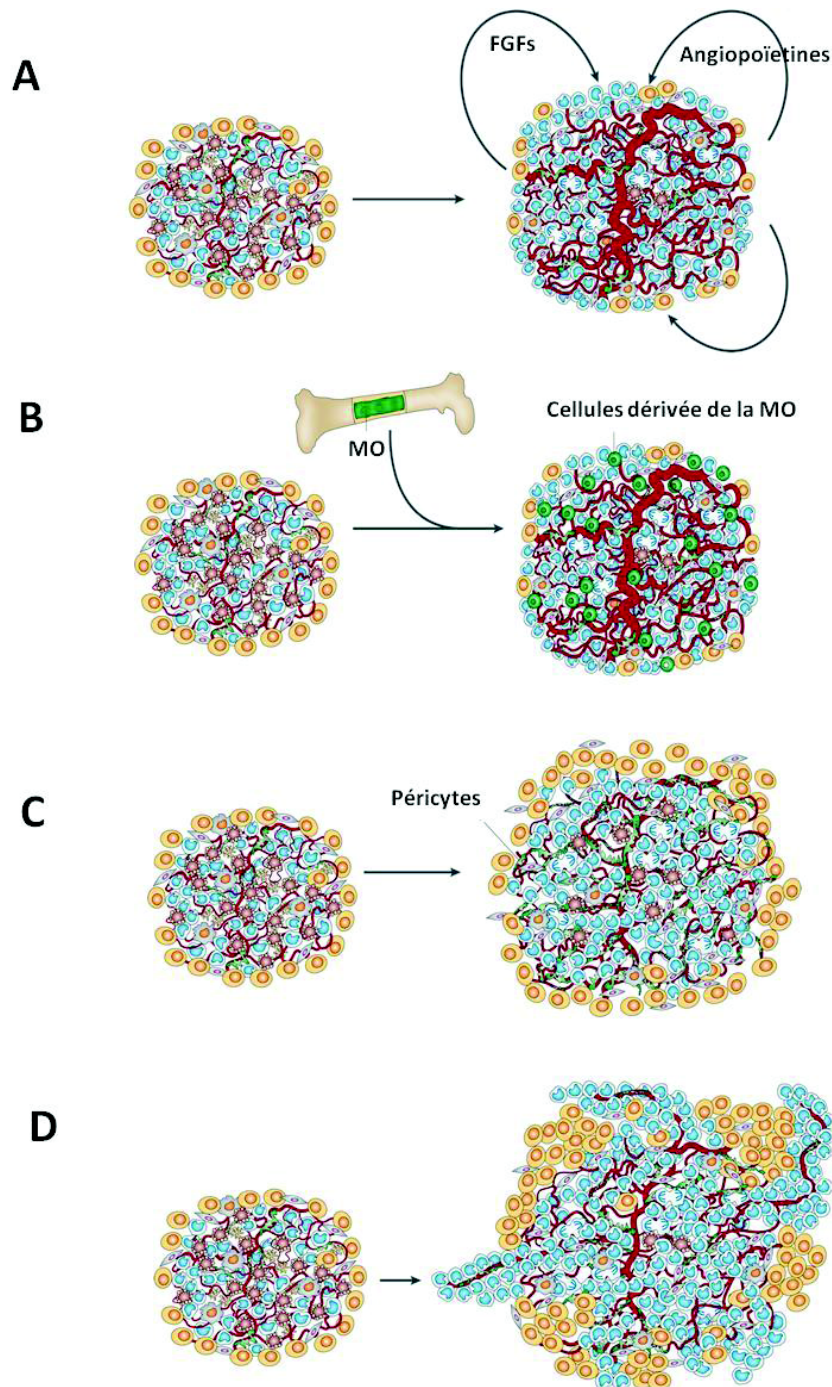


Figure 25. Différents types de résistances aux traitements anti-angiogéniques. **A.** production de facteur pro-angiogénique et lymph-angiogéniques, ce qui permet la revascularisation et la mise en place d'un réseau métastatique, ce qui induit une reprise de la croissance et la dissémination métastatique même sous traitement. **B.** Les conditions hypoxiques dans lesquelles se développe la tumeur induisent la production de cytokines qui favorisent le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (MO). Ces cellules favorisent l'angiogenèse et el la progression tumorale sous traitement. **C.** e recrutement de péricytes permet la maturation des vaisseaux et une normalisation vasculaire, ce qui permet la résistance des vaisseaux aux traitements anti-angiogénique. **D.** Les cellules tumorales évoluant dans un environnement devenu pauvre en oxygène et en nutriments, vont acquérir des capacités accrues d'invasion et de dissémination sous traitement (*D'après Bergers et Hanahan., 2008*)

III.4. Identification de biomarqueurs prédictifs de réponse : une nécessité

Selon le type de cancer et le type d'agent anti-angiogénique, la réponse des patients est donc très hétérogène et peut être même parfois délétère. Si l'on prend en considération cette grande hétérogénéité de la réponse des tumeurs aux thérapies anti-angiogéniques, il apparaît donc crucial de définir des facteurs susceptibles de prédire l'efficacité mais aussi les effets indésirables de ces thérapies. Afin de réussir dans la recherche de tels biomarqueurs, il est important de prendre en compte leur degré de dépendance au processus angiogénique. Cependant, comme nous l'avons vu, de plus en plus d'études montrent que les mécanismes d'échappement des tumeurs aux thérapies anti-angiogéniques ne passent pas seulement par une régulation du processus angiogénique, mais que les cellules tumorales elles même mettent en place des mécanismes moléculaires à travers lesquels elles favorisent leur survie lorsqu'elles se retrouvent dans un environnement hautement hypoxique. Aussi, la recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies anti-angiogéniques doit prendre en compte les caractéristiques moléculaires des tumeurs et pas seulement leur caractère angiogénique. A l'heure actuelle, aucun marqueur prédictif de réponse aux thérapies anti-angiogéniques n'est utilisé en clinique pour sélectionner les patients à traiter. Cependant, certains marqueurs potentiels émergent sur la base des résultats d'essais cliniques. Ils peuvent se subdiviser en 2 grandes classes : les marqueurs circulants et les marqueurs intra-tumoraux.

III.4.1. Les biomarqueurs circulants

Dans le cadre de la recherche d'un marqueur de réponse aux thérapies anti-angiogéniques, le VEGF-A était un candidat tout désigné. En effet, la théorie prédominante était que de hauts niveaux de VEGF-A pourraient signifier une plus grande dépendance des tumeurs à leur vasculature. Cependant, une méta-analyse réalisée sur 1816 patients inclus dans des essais de phase III a récemment démontré que les taux de VEGF-A plasmatique avant traitement avaient une valeur négative sur le pronostic, mais ne prédisaient pas la réponse au BVZ de patients porteurs de carcinomes colorectaux, rénaux ou de CBnPCs (Hegde et al., 2013). Dans cette étude, les taux plasmatiques de VEGF-A n'étaient pas corrélés aux taux intra-tumoraux détectés par immunohistochimie. A l'inverse, la mise au point d'un ELISA permettant de quantifier spécifiquement l'isoforme hautement diffusible VEGF₁₂₁ a permis de trouver une corrélation entre de hauts niveaux plasmatiques de cette isoforme avant traitement et une

meilleure réponse au BVZ en terme de survie des patients porteurs de cancers du sein (étude AVADO, Miles et al., 2013), du pancréas (étude AViTA, Kindler et al., 2011) ou de l'estomac (étude AVAGAST, Van Cutsem et al., 2012a) . A l'inverse, aucune corrélation n'a été retrouvée entre les taux plasmatiques du VEGF₁₂₁ et la réponse au BVZ dans les cancers du poumon (étude AVAIL, Jayson et al., 2012), colorectaux (étude AVF2107g, Jayson et al., 2012) ou rénaux (étude AVOREN, Jayson et al., 2012). Ces résultats soulignent donc la nécessité de développer des outils permettant de détecter spécifiquement chacune des isoformes du VEGF-A, ainsi que d'envisager leur rôle spécifique dans les différents types tumoraux. Dans les cancers du rectum et les cancers du sein, de hauts niveaux plasmatiques de sVEGFR1 ont été inversement corrélés à la réponse au BVZ ou aux VEGFR TKI (Willett et al., 2009). A l'inverse, certaines études ont montré que les niveaux plasmatiques avant traitement du sVEGFR2 chez les patients atteints de cancers colorectaux n'étaient pas associés à la réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Cependant dans ces mêmes études, les patients ayant un niveau bas de soluble VEGFR2 montraient une amélioration de la survie sans progression, faisant du sVEGFR2 un marqueur pronostic plutôt que de réponse au BVZ. Dans les carcinomes hépatocellulaires et colorectaux, des niveaux plasmatiques élevés d'IL-8 ou d'angiopoïétine 2 ont eux aussi été associés à une meilleure réponse au BVZ (Goede et al., 2010; Kaseb et al., 2012).

D'autre part, et comme mentionné dans la partie précédente, les thérapies anti-angiogéniques régulent l'expression de facteurs circulants autres que le VEGF-A. Leurs variations pourraient donc en faire des marqueurs de réponse potentiels. Concernant les taux circulants de VEGF-A après traitement, les résultats vont dans tous les sens, certaines études rapportant une augmentation ou une diminution de ces taux circulants chez les patients ayant reçu du Bevacizumab (Lambrechts et al., 2013). Ces différences pourraient être liées au fait que le VEGF-A est tout ou en partie lié au BVZ dans le plasma de ces patients, ce qui rend son dosage sous forme libre difficile à interpréter. A l'inverse, l'augmentation plasmatique de PlGF en réponse au Bevacuzimab est un marqueur de bon pronostic chez les patients porteurs de cancers colorectaux (Willett et al., 2009), mais aussi chez les patients porteurs de glioblastomes traités avec Cedratinib lors d'essais en phase II de cet agent (Batchelor et al., 2010). Dans cette dernière étude, de hauts niveaux plasmatiques de PlGF ont été corrélés avec la réponse et la survie des patients. Dans les cancers du poumon, un faible niveau plasmatique d'ICAM1 et un haut niveau de bFGF après traitement ont été corrélés à la réponse dans l'étude AVAIL.

III.4.2. Les biomarqueurs intra-tumoraux

Parallèlement à la recherche de biomarqueurs circulants, d'autres études se sont intéressées aux niveaux intra-tumoraux d'acteurs de la voie VEGF/VEGFR comme biomarqueurs potentiels. Dans les cancers colorectaux, une analyse immunohistochimique dans les cellules tumorales et endothéliales du VEGF-A, des NRPs, et de l'EGFR n'a pas retrouvé de corrélation entre leur niveau d'expression et la réponse au BVZ (Custodio et al., 2013). A l'inverse, dans les cancers colorectaux métastatiques, une étude australienne a montré une association entre de bas niveaux d'expression du VEGFR1 et une meilleure survie en réponse au BVZ (étude AGITG MAX, Price et al., 2011). De plus, dans les cancers colorectaux métastatiques, les patients présentant un ratio $VEGF_{165b} : VEGF_{165}$ en dessous de la médiane lorsque traités avec une combinaison FOLFOX+BVZ, comparativement à ceux traité au FOLFOX seul, présentent une meilleure réponse au BVZ. Ces résultats suggèrent qu'un ratio $VEGF_{165b} : VEGF_{165}$ bas pourrait constituer un marqueur de réponse au BVZ dans les cancers colorectaux (Bates et al., 2012). Dans une série de 700 patients porteurs de cancers gastriques, de faibles niveaux intra-tumoraux de NRP1 ont été associés à une meilleure survie des patients traités par BVZ (Van Cutsem et al., 2012), faisant de la NRP1 un marqueur de réponse prometteur. Enfin, de nombreuses études se sont penchées sur l'impact des polymorphismes génétiques touchant par exemple *VEGF-A*, *VEGFR1* ou *VEGFR2* dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques (Lambrechts et al., 2013). Dans les cancers du sein, des polymorphismes du *VEGF-A* ont été associés à une augmentation de la survie globale de patientes traitées par association BVZ/paclitaxel (Jalal et al., 2010).

III.4.3. Un modèle pour sélectionner les patients à traiter

En rassemblant les données concernant les marqueurs de réponse identifiés dans les différents essais cliniques, un modèle permettant de prédire la réponse des patients a été proposé par Lambrechts et collaborateurs. Dans ce modèle, les patients les plus susceptibles de répondre aux thérapies anti-angiogéniques (figure 26) seraient ceux qui possèdent : **(1)** une expression élevée de l'isoforme courte $VEGF_{121}$, à l'origine d'une structure désorganisée des vaisseaux tumoraux avec un diamètre très irrégulier, de nombreuses fuites et dépourvus d'une couche de péricytes ; ces vaisseaux seraient donc plus sensibles au BVZ ; **(2)** de bas niveaux de VEGFR1 qui pourraient prévenir l'activation du VEGFR1 par le PlGF et/ou la trans-

phosphorylation du VEGFR2 à l'origine du processus d'angiogenèse et/ou du recrutement de cellules inflammatoires par la tumeur ; **(3)** un faible taux plasmatique de sVEGFR1 empêchant la compétition entre sVEGFR1 et BVZ pour la liaison au VEGF-A ; **(4)** une faible expression intra-tumorale de NRP1 puisque des effets synergiques de la combinaison BVZ et anticorps anti-NRP1 ont été observés et que la NRP1 est impliquée dans l'apparition de cellules souches cancéreuses. A l'inverse, les patients résistants aux thérapies anti-angiogéniques seraient ceux possédant : **(1)** de hauts niveaux d'expression des isoformes VEGF₁₆₅ et/ou VEGF₁₈₉ témoignant de vaisseaux plus mûres, moins chaotiques et mieux perfusés ; **(2)** de hauts niveaux plasmatiques de sVEGFR1 compétant avec le BVZ ; **(3)** de hauts niveaux de VEGFR1 intra-tumoraux à l'origine d'une augmentation de la survie des cellules tumorales ; **(4)** de hauts niveaux de NRP1 intra-tumoraux ; **(5)** une infiltration importante du micro-environnement tumoral par des macrophages, des fibroblastes et/ou des cellules myéloïdes sécrétant de nombreuses molécules pro-angiogéniques telles que l'interleukine-8 (IL-8), le bFGF, le PDGF-BB, le PDGF-C, le VEGF-C et le VEGF-D (Lambrechts et al., 2013).

Cette conception reste tout de même un modèle, car nombre de ces résultats sont encore à valider, et notamment la réalité de l'association de ces différents marqueurs dans les tumeurs humaines. Cependant, et de façon intéressante, ce modèle suggère que les variants d'épissage du VEGF-A pourraient servir de marqueurs de réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Il renforce donc la nécessité d'étudier l'expression et le rôle de ces différents variants du VEGF-A dans les tumeurs humaines en réponse ou non aux thérapies anti-angiogéniques.

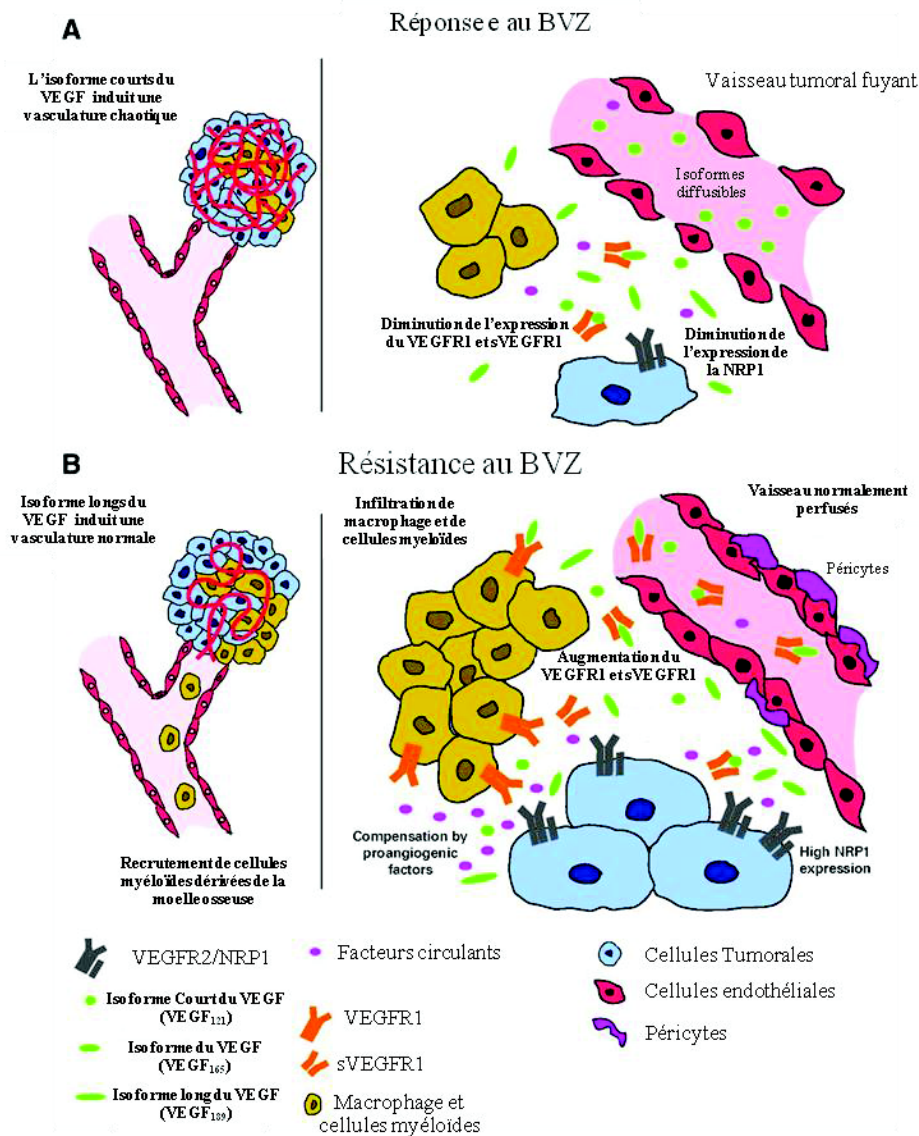


Figure 26. L'expression des différents isoformes du VEGF-A et de leurs récepteurs en tant que biomarqueurs de réponse au BVZ. a. Caractéristiques d'une tumeur qui répond au BVZ. b. Caractéristiques d'une tumeur résistante au BVZ. (D'après Lambrechts et al., 2013)

De la même façon l'hypothèse selon laquelle l'expression du VEGF-A serait capable d'affecter la réponse aux thérapies anti-EGFR est soutenue par les résultats *in vivo* et *in vitro* dans divers types tumoraux. Il a été montré que les cellules surexprimant le VEGF-A étaient résistantes aux anticorps ciblant l'EGFR *in vivo* (Violoria-Petit et al., 2001). Ces mêmes résultats sont retrouvés dans les tumeurs du colon et de la prostate possédant une résistance acquise au gefitinib ou au cetuximab et qui démontrent des niveaux plus élevés de VEGF-A (Bianco et al., 2008). De plus, des modèles de xénogreffes de CBnPCs ayant des résistances acquises à l'erlotinib démontrent des niveaux de VEGF-A plus élevés (Naumov et al., 2009). Ces études, bien que suggérant une implication du VEGF-A dans la résistance aux EGFR TKI, ne se sont pas intéressées aux variations des différents isoformes du VEGF-A. Il serait intéressant de rechercher les variations des niveaux des variants du VEGF-A dans ces mêmes modèles. Il faut noter que nos expériences n'ont montré aucune variation dans les niveaux d'expression et/ou de phosphorylation de l'EGFR suite au traitement par BVZ dans nos lignées d'adénocarcinomes pulmonaires présentant un EGFR sauvage. Il serait intéressant de le confirmer en utilisant un VEGFR TKI sur les mêmes lignées. Il serait aussi intéressant de tester l'effet du BVZ et/ou d'un VEGFR TKI sur des lignées présentant un EGFR muté. De manière intéressante, il semblerait que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ puissent aussi jouer un rôle dans la résistance aux thérapies ciblant EGFR. En effet, une étude récente a démontré que l'intégrine $\beta 1$ serait impliquée dans la résistance aux EGFR TKIs via la promotion de l'EMT (Ju et Zhou, 2013). D'autre part, il a été montré qu'une activation de Src à travers l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ augmente la résistance aux anti-IGF1R dans les cellules de CBnPCs (Shin et al., 2013). Cette étude suggère que la combinaison d'agents ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ avec des anti-IGF1R pourrait rendre les cellules plus sensibles aux anti-IGF1R. Dans le contexte de ces études, il serait intéressant de rechercher une possible implication de la voie VEGF/VEGFR dans les résistances liées à une surexpression des intégrines $\beta 1$ ou $\beta 3$.

Objectifs des travaux de thèse

Objectifs des travaux de thèse

La prise en charge en clinique des patients atteints de CBnPCs s'est nettement améliorée depuis l'apparition des thérapies ciblées. Les thérapies anti-angiogéniques, notamment ont été largement plébiscitées pour leurs effets sur la formation du réseau vasculaire et leur toxicité modérée. Le BVZ est le chef de file de ces thérapies. Il est utilisé dans le traitement de plusieurs types de tumeurs solides, dont les CBnPCs où il est associé à des chimiothérapies à base de sels de platine notamment. Cependant, le constat clinique est sans appel car certains patients répondent à ces traitement alors que d'autres semblent y être réfractaires dès le départ. De plus, l'expérience clinique nous a montré que même les patients qui répondent à ces traitements finissent inéluctablement par y échapper. Un des objectifs général de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse est de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression des tumeurs pulmonaires ainsi que d'identifier des marqueurs susceptibles de conditionner la réponse des tumeurs pulmonaires aux thérapies ciblées et notamment les thérapies anti-angiogéniques. Dans ce cadre, une partie de l'équipe s'intéresse au rôle de l'épissage alternatif des transcrits via notamment l'analyse de gènes candidats dont l'épissage différentiel serait susceptible de modifier la réponse aux thérapies. La découverte que l'épissage alternatif du *VEGF-A* dans les cellules endothéliales donnait naissance à deux sous-familles aux fonctions distinctes, les isoformes pro-(VEGF_{xxx}) et anti-(VEGF_{xxx}b) angiogéniques, nous a poussé à investiguer le rôle de ces variants d'épissage du VEGF-A dans les CBnPCs.

En accord avec une dérégulation de certains facteurs régulant l'épissage alternatif des transcrits au cours de la carcinogenèse broncho-pulmonaire, nous avons précédemment montré au laboratoire que les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR, les protéines SRSF1 et SRSF2, sont surexprimés dans les CBnPCs comparativement aux tissus normaux (Gout et al., 2012). Dans différents modèles cellulaires dérivés de CBnPCs, nous avons aussi montré que la protéine SRSF2 régule l'épissage du VEGF-A en faveur des isoformes VEGF_{xxx}b (Merdzhanova et al., 2010). Finalement, nous avons décrit l'expression des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 et de leurs corécepteurs, les NRP1 et 2 dans les tumeurs pulmonaires de différents types histologiques, incluant les adénocarcinomes et les carcinomes

squameux (Lantuéjoul et al., 2003). Ces données nous ont mené à émettre l'hypothèse selon laquelle l'épissage alternatif du *VEGF-A* pourrait être altéré dans les CBnPCs et pourrait contrôler la prolifération des cellules tumorales pulmonaires via une boucle autocrine dépendante du VEGF-A. Dans ce contexte, nous avons aussi émis l'hypothèse selon laquelle le traitement par les thérapies anti-angiogéniques, et notamment le BVZ, n'affecterait pas seulement les cellules endothéliales mais aussi les cellules tumorales.

Sur la base de ces hypothèses de travail, l'objectif de ma thèse a donc été d'investiguer le rôle des variants d'épissage du *VEGF-A*, les isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b}, dans les CBnPCs. Dans ce contexte, mes objectifs plus spécifiques ont été d'analyser : **(1)** « *in situ* » le statut des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} dans les CBnPCs et de corrélérer ce statut avec les paramètres clinico-pathologiques ; **(2)** le rôle de ces isoformes dans le contrôle d'une boucle autocrine sur les cellules tumorales dérivées de CBnPCs ; **(3)** l'effet des thérapies anti-angiogéniques et notamment du Bevacizumab sur le ratio de ces isoformes et les conséquences d'une modulation de la boucle autocrine dépendante de ces isoformes par les thérapies anti-angiogéniques.

Nos premiers résultats ont permis de montrer que l'isoforme VEGF_{165b} mais pas l'isoforme VEGF₁₆₅, s'accumule en réponse aux thérapies anti-angiogéniques et active une signalisation autocrine dépendante des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 à travers laquelle elle induit la prolifération, la migration et la résistance aux thérapies de cellules dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires. En accord avec un rôle de cette isoforme dans la progression tumorale des CBnPCs, nous avons montré « *in situ* » une association entre des niveaux intra-tumoraux élevés de VEGF_{165b}, l'envahissement ganglionnaire et la phosphorylation du récepteur VEGFR1. A l'inverse, nos résultats ont révélé une fonction inattendue du VEGF₁₆₅ en tant que facteur pro-apoptotique dans nos modèles cellulaires. L'ensemble de ces données fait l'objet de l'**article 1** de la partie Résultats. Cet article est actuellement en cours de finalisation.

Contrairement à ce qui était décrit dans les cellules endothéliales dans lesquelles le VEGF_{165b} signale mais de façon transitoire et inefficace, nos résultats ont montré qu'il était capable

d'induire une phosphorylation prolongée des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 dans nos modèles cellulaires. Il a été rapporté que l'échec du VEGF_{165b} à induire un signal angiogénique serait dû au fait que cet isoforme ne lie pas les NRPs. Dans une seconde étude, nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes moléculaires par lesquels le VEGF_{165b} signale dans les cellules tumorales. Notamment, nous nous sommes interrogés sur le fait que le VEGF_{165b} puisse induire une signalisation suffisamment forte en activant d'autres molécules membranaires. Nos résultats identifient l'intégrine beta 1 comme une nouvelle cible de l'isoforme VEGF_{165b} par laquelle il active une voie de signalisation conduisant à la polymérisation de l'actine sous la forme de fibres de stress. De façon importante, nous mettons en évidence que le traitement des cellules tumorales pulmonaires par le BVZ induit la formation de ces fibres de stress par un mécanisme dépendant du VEGF_{165b} et de l'intégrine beta 1, mais aussi de l'intégrine $\beta 3$. L'ensemble de ces données fait l'objet de l'**article 2** de la partie Résultats. Cet article est actuellement en préparation.

RESULTATS

RESULTS

Article 1

Pre-mRNA alternative splicing controls VEGF-A autocrine functions and response to Bevacizumab in Non Small Cell Lung Carcinoma

Asma Boudria^{1,2}, Stephanie Gout^{1,2}, Michelle Keramidas^{2,3}, Stefania Dermendjieva^{1,2}, Jean-Luc Coll^{2,3}, Sylvie Lantuejoul^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{1,2}, Sylvie Gazzeri^{1,2*} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹ INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U823, Equipe 5 Cibles Thérapeutiques et Diagnostiques et Vectorisation de Drogues dans le Cancer du Poumon, Grenoble, 38042, France.

Word count of the manuscript: 5532

Running title: VEGF165b and tumor progression

* Corresponding authors:

Dr. Beatrice Eymin / Dr Sylvie Gazzeri

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr / Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

1. Contexte scientifique et objectifs de l'étude

Le VEGF-A est l'un des facteurs les plus importants dans la régulation de la néo-angiogénèse tumorale. Le rôle que joue ce facteur dans la promotion de la survie et de la migration des cellules endothéliales en a fait une cible de choix pour le développement de thérapies anti-angiogéniques. Le Bevacizumab (BVZ), un anticorps monoclonal humanisé qui lie le VEGF et empêche son interaction avec ses récepteurs, est actuellement utilisé en traitement de première ligne des CBnPCs en combinaison avec certains agents chimiothérapeutiques. Cependant, les bénéfices sur la survie globale observés après traitement au BVZ restent très modestes. Par ailleurs, certains patients traités au BVZ semblent y être d'emblée réfractaires alors que d'autres répondent à ce traitement mais finissent inexorablement par développer des résistances. Aucun biomarqueur prédictif de réponse au BVZ n'a été identifié à ce jour. Il apparaît qu'en plus de ses fonctions paracrines sur les cellules endothéliales, le VEGF-A exerce aussi une fonction autocrine dans différents types de cancers exprimant les récepteurs du VEGF (VEGFRs) et/ou leurs co-récepteurs neuropilines (NRPs). Cependant, l'effet du VEGF-A semble être plus complexe que ce que l'on pensait, car cette action autocrine ne se limite pas à la promotion de la survie, de la migration et/ou de l'invasion des cellules tumorales. En effet, certaines études ont pu démontrer un effet anti-tumoral du VEGF-A. Il est bien établi que l'épissage alternatif des 8 exons constituant le pré-ARNm du VEGF-A donne naissance à une famille d'isoformes de tailles variables nommées VEGF_{xxx}, le xxx représentant le nombre d'acides aminés présents dans leur séquence d'acide aminés. Récemment, une nouvelle famille d'isoformes, résultant de la sélection d'un site d'épissage distal au niveau de l'exon 8 a été décrite. Ces isoformes, appelés VEGF_{xxx}b, sont retrouvées dans plusieurs tissus sains, dans le plasma et dans les tissus tumoraux avec des niveaux d'expression variables. Ces deux familles d'isoformes possèdent des effets antagonistes sur les cellules endothéliales, les VEGF_{xxx} étant pro-angiogéniques alors que les VEGF_{xxx}b seraient anti-angiogéniques. L'étude du rôle paracrine des isoformes VEGF_{xxx}b a révélé des effets dans l'inhibition de la néo-angiogénèse, la croissance tumorale et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques. En contre partie, très peu de travaux se sont intéressés aux fonctions autocrines de ces isoformes dans les tumeurs. Dans ce contexte, l'objectif principal de notre étude était de déterminer le statut d'expression et les fonctions biologiques des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF₁₆₅b dans les tumeurs primaires et dans des modèles cellulaires de CBnPC.

2. Résultats

2.1. De hauts niveaux intra-tumoraux de VEGF_{165b} sont associés à un envahissement ganglionnaire dans les CBnPCs

Une analyse « *in situ* » des niveaux d'expression de l'isoforme VEGF_{165b} et du VEGF_{total} a été réalisée dans une série de tumeurs de patients atteints de CBnPCs n'ayant pas été traités et dans des tissus pulmonaires sains. Les résultats obtenus montrent peu de variations des niveaux d'expression du VEGF_{165b} dans les tissus pulmonaires sains. A l'inverse, dans les adénocarcinomes et les carcinomes pulmonaires squameux, les niveaux d'expression de cet isoforme sont très hétérogènes, certains patients présentant de hauts niveaux de VEGF_{165b} et d'autres de bas niveaux. Aucune corrélation entre l'expression du VEGF_{165b} et celle du VEGF_{total} n'est retrouvée dans notre série. A l'inverse, des scores élevés de VEGF_{165b} sont corrélés à un envahissement ganglionnaire. Cette analyse démontre des niveaux d'expression différentiels du VEGF_{165b} dans les CBnPCs et suggère un rôle de cet isoforme dans la progression des CBnPCs.

2.2. Le VEGF_{165b} induit une augmentation de l'agressivité des CBnPCs à travers une boucle autocrine de signalisation

Afin d'évaluer la contribution d'une signalisation autocrine dépendante du VEGF_{165b} dans les cellules de CBnPCs, nous avons généré des clones stables surexprimant cet isoforme. Nos résultats montrent que le VEGF_{165b} surexprimé induit une augmentation de la prolifération dans ces cellules comparativement au contrôle. Il en est de même lorsque des cellules naïves sont cultivées en présence de milieu de culture provenant de ces clones. Nous avons aussi montré que ces clones surexprimant le VEGF_{165b} avaient un potentiel migratoire et invasif plus important, sécrétaient plus de metalloprotéases actives et étaient plus résistants à l'apoptose chimio-induite et à l'hypoxie. Ces données démontrent un effet autocrine du VEGF_{165b} qui favoriserait l'apparition d'un phénotype plus invasif dans les cellules de CBnPCs.

Au cours de nos expérimentations, toutes nos tentatives pour générer des clones surexprimant l'isoforme VEGF₁₆₅ se sont soldées par un échec. Afin de comprendre l'impact de la modulation du ratio de ces isoformes sur les cellules de CBnPCs, et considérant qu'ils exercent des effets antagonistes sur les cellules endothéliales, nous avons traité nos cellules avec des ligands recombinants rhVEGF₁₆₅ ou rhVEGF_{165b}. Nos résultats montrent que les cellules traitées au rhVEGF_{165b} ont une croissance plus importante comparativement aux cellules contrôle. A l'inverse, et de manière surprenante, nos résultats révèlent un effet pro-apoptotique du VEGF₁₆₅ dans nos modèles cellulaires. De plus, le rhVEGF_{165b} pourtant décrit comme un faible activateur des VEGFRs dans les cellules endothéliales et un antagoniste de l'angiogenèse, induit une accumulation des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sous forme phosphorylée, ainsi qu'une augmentation de l'expression des neuropilines 1 et 2 dans nos modèles cellulaires. Cette activation des récepteurs VEGFR2 et VEGFR1 est accompagnée par une accumulation de P-ERK1/2 et de P-p38MAPK. L'expression de certains marqueurs d'EMT après traitement au VEGF_{165b} confirme encore une fois le caractère agressif que confère cette signalisation autocrine dépendante du VEGF_{165b} aux cellules de CBnPC. En accord avec ces données, l'analyse immunohistochimique de tumeurs issues de patients atteints de CBnPCs et n'ayant pas été traités montre une corrélation entre de hauts niveaux de VEGF_{165b} et de hauts niveaux de P-VEGFR1(Tyr 1213) d'une part, et d'autre part, une association significative entre de hauts niveaux de VEGF_{165b} et une expression accrue de NRP2. L'association entre les niveaux de VEGF_{165b} et de ceux de la NRP1 étant moins significative dans ces tumeurs.

2.3. Le Bevacizumab prévient l'apoptose induite par les sels de platine à travers une augmentation de l'expression du VEGF_{165b}

De façon importante, nous montrons que le traitement par le BVZ, aussi bien que par le SU5416, induit une accumulation du VEGF_{165b} dans les cellules de CBnPCs. Un effet similaire sur l'expression du VEGF_{165b} est observé après traitement au cisplatine et est associé à une diminution du niveau de VEGF_{total}. Cette augmentation de l'expression du VEGF_{165b} est plus importante lorsque le BVZ et le cisplatine sont combinés. Par ailleurs, nous montrons que la modification du ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total} en faveur du VEGF_{165b}, soit après traitement au BVZ, soit dans les clones surexprimant cette isoforme, induit une résistance à l'apoptose chimio-induite. La neutralisation du VEGF_{165b} par ARN interférence

prévient d'une part l'augmentation de la prolifération induite par BVZ, et d'autre part, sensibilise les cellules de CBnPCs à l'apoptose induite par le cisplatine. Cela indique qu'une augmentation des niveaux de VEGF_{165b} en réponse aux agents anti-angiogéniques et chimiothérapeutiques pourrait participer à l'échappement des tumeurs à l'apoptose. Nos résultats indiquent aussi que le traitement par BVZ induit une signalisation autocrine contrôlée par le VEGF_{165b} et dépendante de l'activation de ses récepteurs, qui résulte en l'apparition de marqueurs d'EMT et une sécrétion plus importante de métalloprotéases actives.

2.4. La signalisation autocrine induite par le VEGF_{165b} contrôle la croissance des CBnPCs

Finalement, nous avons essayé de valider « *in vivo* » certains de nos résultats obtenus « *in vitro* ». Nous avons dans un premier temps généré des xénogreffes dérivées de CBnPCs surexprimant le facteur d'épissage SRSF6. Cette protéine favorise l'expression des isoformes VEGF_{xxx}b au détriment des autres variants d'épissage dans les cellules épithéliales normales (Rennel et al., 2008). Nous avons confirmé dans notre modèle cellulaire que la surexpression de SRSF6 augmente l'expression du VEGF_{165b} comparativement aux cellules contrôle. Ces clones stables surexprimant la protéine SRSF6 exprimant des niveaux de VEGF_{165b} similaires à ceux observés après traitement au BVZ nous ont semblé être un modèle plus pertinent que les clones VEGF_{165b} dont l'expression de cette isoforme est environ 10 fois supérieure aux taux physiologiques. Nos résultats montrent que les xénogreffes surexprimant SRSF6 et le VEGF_{165b} ont une croissance plus rapide comparativement au contrôle. Cette croissance accélérée ne semble pas dépendre de la densité vasculaire puisque aucune variation significative n'a été observée après marquage au CD31 et α SMA entre les deux groupes.

La surexpression d'un facteur d'épissage comme SRSF6 pouvant affecter l'expression d'autres facteurs influant sur le développement tumoral, nous avons procédé autrement, cette fois-ci en traitant ou non des xénogreffes dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire au BVZ combiné ou non à un ARN interférent ciblant le VEGF_{165b}. Nous montrons que les tumeurs n'exprimant plus l'isoforme VEGF_{165b} ont une croissance plus lente que les tumeurs contrôle. Dans ces mêmes tumeurs, une analyse immunohistochimique montre que l'expression des

protéines KI67, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2 et NRP2 est diminuée en comparaison aux tumeurs contrôle, alors qu'aucune différence n'est observée en terme d'angiogenèse ou de maturation des vaisseaux sanguins après marquage CD31 ou α SMA. Ces résultats suggèrent que la diminution des volumes tumoraux ne serait pas due à une altération de l'angiogenèse mais à celle de l'expression du VEGF_{165b}. D'autre part, nos résultats montrent que le BVZ n'a pas d'effet significatif sur la croissance tumorale. Cependant, ces tumeurs traitées par BVZ montrent des niveaux plus élevés de KI67, P-VEGFR1 (Tyr1213), VEGFR2, NRP2 et VEGF_{165b}, ainsi que des niveaux plus bas de E-cadhérine comparativement aux tumeurs contrôles. Ces effets observés suite au traitement par BVZ sont prévenus lorsque cet agent est combiné avec un ARNi ciblant le VEGF_{165b}. Ces résultats confirment le rôle du VEGF_{165b} dans la promotion de la croissance des CBnPC « *in vivo* » à travers l'activation d'une boucle autocrine de signalisation dépendante des VEGFRs. Ils suggèrent aussi que le BVZ est capable d'activer cette boucle.

3. Conclusions

Nos résultats identifient des profils d'expression variables du VEGF_{165b} chez les patients atteints de CBnPCs. Nos données « *in situ* » montrent que de hauts niveaux de cette isoforme sont corrélés à un potentiel invasif plus important. Ces données sont en accord avec nos résultats « *in vitro* » et « *in vivo* » montrant que le BVZ, en association ou non aux sels de platine, augmente l'expression du VEGF_{165b}, et que ce dernier est capable d'activer une boucle de signalisation autocrine dépendante des VEGFR1/VEGFR2/VEGF_{165b}. Cette signalisation autocrine induit l'apparition d'un phénotype plus invasif dans les CBnPCs. L'accumulation du VEGF_{165b} induite par le BVZ favorise la résistance de ces tumeurs au BVZ et aux chimiothérapies. A travers cette étude, nous montrons que la signalisation autocrine dépendante de l'isoforme VEGF_{165b} est impliquée dans la progression des CBnPCs et leur échappement au traitement par BVZ, et que cette isoforme pourrait être un marqueur de réponse aux thérapies dans les adénocarcinomes pulmonaires.

Pre-mRNA alternative splicing controls VEGF-A autocrine functions and response to Bevacizumab in Non Small Cell Lung Carcinoma

Asma Boudria^{1,2}, Stephanie Gout^{1,2}, Michelle Keramidas^{2,3}, Stefania Dermendjieva^{1,2}, Jean-Luc Coll^{2,3}, Sylvie Lantuejoul^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{1,2}, Sylvie Gazzeri^{1,2*} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹ INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U823, Equipe 5 Cibles Thérapeutiques et Diagnostiques et Vectorisation de Drogues dans le Cancer du Poumon, Grenoble, 38042, France.

Word count of the manuscript:

Running title: VEGF₁₆₅b and tumor progression

* Corresponding authors:

Dr. Beatrice Eymin / Dr Sylvie Gazzeri

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr / Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

Abstract

VEGF-A is the target of anti-angiogenic therapies including Bevacizumab. It is highly subjected to pre-mRNA alternative splicing that generates splice variants with both pro-(VEGF_{xxx}) and anti-(VEGF_{xxx}b) angiogenic properties. Interestingly, recent studies highlighted VEGF-A isoforms as potential biomarkers of tumor response to Bevacizumab. Here, we show that Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLCs) exhibit a differential expression pattern of the VEGF₁₆₅b splice variant, and demonstrate that high levels of VEGF₁₆₅b correlate with lymph node metastases. At the molecular level, we identify an invasive VEGFR1/VEGFR2-controlled autocrine loop activated by VEGF₁₆₅b while inhibited by VEGF₁₆₅. Finally, we demonstrate in vitro and in vivo that bevacizumab combined or not with platinum salts specifically increases the expression of the VEGF₁₆₅b protein, thereby selecting cells with a more aggressive phenotype. Overall, we highlight the VEGF₁₆₅b splice variant as a marker of progression and response to anti-angiogenic therapies in NSCLC, while unravel an unexpected anti-invasive function of the VEGF₁₆₅ isoform.

Statement of significance

It is known since one decade that VEGF-A pre-mRNA alternative splicing generates splice isoforms with antagonist activities on endothelial cells. Here, we demonstrate that VEGF-A pre-mRNA alternative splicing also controls VEGF-A autocrine functions on tumor cells in an opposite manner and more importantly is regulated by anti-angiogenic therapies. We provide a new molecular explanation for NSCLC escape from anti-angiogenic treatments.

Introduction

Angiogenesis, the complex process by which new blood vessels arise from the pre-existing vasculature, contributes to several pathological processes such as cancer (1, 2). VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) plays a crucial role in different aspects of tumor-induced angiogenesis. It binds to its cognate tyrosine kinase receptors VEGFR-1 (Flt-1) or VEGFR-2 (Flk-1/KDR) and their co-receptors neuropilin-1 and neuropilin-2, leading to the activation of downstream signaling pathways that control proliferation, survival and migration of endothelial cells (3, 4). To date, several anti-angiogenic therapies have been developed that inhibit VEGF-A or VEGFR tyrosine kinase activity. Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody that binds VEGF-A and prevents its interaction with endothelial VEGFR-1/2, was the first used in clinics (5). Bevacizumab is currently approved in Europe and the US in combination with standard chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer and non-small-cell lung cancer (NSCLC) (6, 7). However, it only results in modest improvement in terms of overall survival. Until now, there is no predictive biomarker to select patients that will benefit from these therapies.

It has become apparent that the function of VEGF-A is not restricted to angiogenesis and vascular permeability (8). Indeed, beside acting on endothelial cells through paracrine signaling, VEGF-A also impacts on tumor cells themselves that express VEGF receptors and neuropilins, including lung tumors (9). Although the VEGF-A-dependent autocrine loop is currently thought to mediate survival, proliferation or invasion of tumor cells (10, 11, 12, 13), more recent studies highlighted another level of complexity regarding VEGF-A biology. As an example, VEGF-A was shown to prevent tumor cell invasion and mesenchymal transition in glioblastoma through a MET/VEGFR2 signaling pathway (14). In addition, in early

squamous lung carcinoma, the presence of high VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 protein levels was associated with a better outcome without significant correlation with microvascular density (15). Therefore, VEGF-A appears to exert dual functions on tumor cells.

It is known since two decades that VEGF-A exists as multiple isoforms generically referred to as VEGF_{xxx} which result from the pre-mRNA alternative splicing of eight exons (16). To date, eight VEGF_{xxx} isoforms have been described, which range in length from 111 to 206 amino acid residues (VEGF₁₁₁₋₂₀₆). Very interestingly, it was recently shown that breast, gastric or pancreatic cancer patients expressing high plasma levels of short VEGF-A isoforms, the most diffusible ones, exhibit improved Progression Free Survival (PFS) and/or Overall Survival (OS) after Bevacizumab treatment (5, 17). These data highlight *VEGF-A* pre-mRNA splicing as a potential reservoir for predictive biomarkers to anti-angiogenic therapies. In 2002, a sister family of VEGF-A isoforms termed VEGF_{xxx}b has been identified (18, 19). VEGF_{xxx}b isoforms are generated by the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final exon 8 of VEGF-A. This leads to the synthesis of proteins of the same length as the VEGF_{xxx} isoforms, but with a distinct C-terminal domain (18). VEGF₁₆₅b transcript and protein are widely expressed in most healthy human tissues and in nonangiogenic tissues (20, 21). At the molecular level, owing to the absence of the basic carboxy-terminal amino acids essential for neuropilin-1 binding, VEGF₁₆₅b cannot trigger a strong and sustained activation of VEGFR2 and inhibits the classical downstream signaling pathways (20, 22, 23). Therefore, VEGF₁₆₅b acts as an anti-angiogenic factor that inhibits tumor growth and is downregulated in various tumors (18, 20, 24, 25). Importantly, VEGF₁₆₅b binds to and inhibits bevacizumab activity leading to escape of treated nude mice xenografts derived from human colorectal carcinoma (26). Moreover, metastatic colorectal cancer patients with a low VEGF₁₆₅b:VEGF_{total} tumor ratio displayed a better outcome when treated with the combination FOLFOX4 +

Bevacizumab compared with FOLFOX4 alone (27). Overall, these data indicate that VEGF₁₆₅b could be a determinant of tumor response to anti-angiogenic therapies, at least in colorectal carcinoma.

We previously demonstrated that overexpression of VEGF₁₆₅b is associated with reduced angiogenesis in nude mice xenografts derived from lung adenocarcinoma cell lines (28). In this study, we further investigated the status and the biological functions of VEGF₁₆₅b and VEGF₁₆₅ splice variants in primary and cellular models of Non Small Cell lung Carcinoma (NSCLC). Unexpectedly, our data demonstrate that VEGF₁₆₅b controls a VEGFR-dependent autocrine loop that is involved in NSCLC progression and response to Bevacizumab treatment.

Results

NSCLC patients exhibit distinct pattern of VEGF₁₆₅b protein expression

In order to investigate the status of VEGF₁₆₅b in lung tumors, we first analyzed its expression in a series of 16 normal lung parenchyma and 74 NSCLCs, including 38 adenocarcinomas (ADC) and 36 squamous cell lung carcinomas (SCC). Immunohistochemistry was performed using a mouse monoclonal IgG1 antibody raised against the nine terminal amino acids of the VEGF₁₆₅b sequence [ab14994; Abcam; (27)]. This antibody was previously shown to have specificity for the VEGF₁₆₅b isoform over the VEGF₁₆₅ and does not cross-react with VEGF₁₆₅ or VEGF₁₂₁ recombinant protein (20, 29). In parallel, the tumoral samples were immunostained for total VEGF-A expression (VEGF-A_{total}) using a pan-VEGF-A antibody

that detects all VEGF-A isoforms (A20; Santa Cruz). In normal lung, cytoplasmic staining of VEGF-A_{total} was depicted in bronchial basal cells and hyperplastic type II pneumonocytes as previously reported [score=50-200; mean score 100; (9, 15)]. Cytoplasmic staining of VEGF_{165b} was also detected in normal bronchial basal cells (score=80-200; mean score 103; Supplementary Figure 1A). A VEGF_{165b}:VEGF-A_{total} ratio ranging from 0.5 to 1.5 was found in the majority of normal lung parenchyma (Supplementary Figure 1B). These results indicated that VEGF_{165b} represents more than, or close to, half of total VEGF-A in normal lung, as it was previously observed in other non-tumoral tissues (29, 30). Compared to these normal lung tissues, NSCLCs displayed a more heterogeneous pattern of VEGF_{165b} expression. Hence, VEGF_{165b} protein level was decreased in 26/74 (35%) or increased in 11/74 (15%) NSCLCs without significant difference between ADC and SCC (Supplementary Table 1). In contrast and consistent with previous data (15), the level of VEGF-A_{total} was higher in ADC (23/38, 60%) than in SCC (14/36, 39%) (p= 0.03; Supplementary Table 1). We did not find a significant correlation between the status of VEGF_{165b} and VEGF-A_{total} in NSCLC (Supplementary Table 2), indicating that VEGF_{165b} staining does not mimic that of pan-VEGF-A, and conversely. Interestingly, a significant proportion of ADC (45%) expressed a low VEGF_{165b}:VEGF-A_{total} ratio (<0.5), while about 30% of SCC displayed a high ratio (>3; Figure 1C), thereby indicating that VEGF-A splice variants are differentially regulated in both histological subtypes. When looking for correlation(s) between VEGF_{165b} status and clinico-pathological parameters, we found a significant association between high scores of VEGF_{165b} and the presence of lymph node metastases (pN+) (Figure 1D; p=0.0258). In contrast, no significant association was observed between VEGF-A_{total} status and all clinico-pathological parameters (pT, pN, pM) in our series (data not shown). Taken together, these results provided the first evidence that the VEGF_{165b} splice variant is differentially expressed in NSCLCs. Similar data were observed in various cellular models derived from

lung ADC or SCC (Supplementary Figure 2). Moreover, our results suggested that despite being an anti-angiogenic factor, VEGF_{165b} could be associated with lung tumor progression.

VEGF_{165b} overexpression induces a more aggressive phenotype

To assess the molecular mechanisms by which the VEGF_{165b} isoform could contribute to tumor progression in NSCLC, we generated stable clones overexpressing VEGF_{165b} in two cellular models derived from lung adenocarcinoma, namely H358 and H1299 cells. We choose these cell lines as they express low amount of VEGF_{165b} (Supplementary Figure 2) (28). Compared to control cells, VEGF_{165b} was highly expressed in both intra-cellular extracts (Figure 2A) and culture supernatants (data not shown) of the selected clones. We noticed that cells overexpressing VEGF_{165b} proliferate faster than their control counterparts (Figure 2B). Similar results were obtained when H358 or H1299 cells were cultured in conditioned medium derived from corresponding VEGF_{165b}-overexpressing clones (Figure 2C). Taken together, these results indicated that VEGF_{165b} stimulates the proliferation of NSCLC tumor cells. Then, we analyzed the impact of VEGF_{165b} on cell migration and invasion. Using a wound healing assay, we demonstrated that H1299 cells overexpressing VEGF_{165b} recover scratch faster than control cells (Figure 2D). Of note, H358 cells were not tested in this assay as they never reach confluence when grown in Petri dishes. However, in transwell assays, H358 cells overexpressing VEGF_{165b} transmigrated more efficiently than control cells (Figure 2E). Moreover, we provided evidence that H1299 cells overexpressing VEGF_{165b} produce more pro-MMP9 and active MMP9 metalloproteinases (Figure 2F) and were more resistant to apoptosis when cultured in hypoxic conditions than H1299 control cells (data not shown). Overall, these results indicated that overexpression of VEGF_{165b} induces a more aggressive

phenotype in two ADC cell lines. Surprisingly, despite repetitive assays, we were not able to generate stables clones overexpressing VEGF₁₆₅ in both cell lines.

rhVEGF₁₆₅ and rhVEGF_{165b} proteins exhibit distinct autocrine functions in NSCLC cells

As our clones exhibited a 30-fold increase in VEGF_{165b} protein expression compared to control cells, we wanted to confirm the above results in a more physiological context. To do so, we treated H358 and H1299 cells with physiological dose of either rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF_{165b} ligand. We showed that cells cultured in presence of rhVEGF_{165b} proliferate faster compared to untreated or to rhVEGF₁₆₅-treated cells (Figure 3A). Conversely, cells transfected with a siRNA targeting specifically the *VEGF_{165b}* isoform grow slower than *mismatch* transfected cells (Figure 3B). Importantly, we noticed that cells treated with rhVEGF₁₆₅ detached from the Petri dishes. Combined with our inability to generate stable clones overexpressing VEGF₁₆₅, these observations strongly suggested that treatment with rhVEGF₁₆₅ could be deleterious. Consistently and very unexpectedly, apoptosis was detected upon rhVEGF₁₆₅ treatment of NSCLC cells (Figure 3C). Taken together, and reminiscent of their antagonistic functions on endothelial cells, these results indicated that VEGF₁₆₅ and VEGF_{165b} isoforms display distinct role in human NSCLC cells.

Since NSCLC cell lines express VEGFR1, VEGFR2, NRP1 and NRP2 receptors, we postulated that VEGF_{165b} and VEGF₁₆₅ could control a VEGFR-dependent autocrine loop. It has been demonstrated that VEGF_{165b} does not activate efficiently VEGFR receptors in endothelial cells owing to its inability to bind neuropilins. However, in H358 tumor cells, rhVEGF_{165b} was able to trigger a persistent accumulation of both P-VEGFR1(Tyr1213) and P-VEGFR2(Tyr1214) proteins, that was associated with accumulation of P-ERK1/2 and P-

p38MAPK (Figure 3D). In addition, neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2) protein (Figure 3D) and mRNA (data not shown) levels significantly increased upon rhVEGF_{165b} treatment. Similar results as regard to VEGF_{165b}-activating VEGFR and p38 MAPK were obtained in H1299 cells (Supplementary Figure 3A). Conversely and consistent with apoptosis occurrence (Figure 3C), rhVEGF₁₆₅ strongly decreased VEGFR1- and VEGFR2-activated signalling pathways in these cells (Figure 3D and Supplementary Figure 3A). This effect was specific of rhVEGF₁₆₅ as neither rhVEGF₁₂₁ nor rhVEGF₁₈₉ ligand was able to induce apoptosis (data not shown). Importantly, sustained activation of both VEGFR1 and VEGFR2 receptors upon rhVEGF_{165b} stimulation correlated with the accumulation of some markers of epithelial to mesenchymal transition, such as N-cadherin, SNAIL, vimentin and fibronectin (Figure 3E). These EMT features were not observed in rhVEGF₁₆₅-treated cells. Overall, these results indicated that VEGF_{165b} but not VEGF₁₆₅ activates a VEGFR-dependent autocrine loop in NSCLC cells, leading to the appearance of cells with a more invasive phenotype.

High levels of VEGF_{165b} correlate with high levels of P-VEGFR1(Tyr1213), NRP1 and NRP2 proteins in NSCLC

The above results prompted us to analyze the status of VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2, P-VEGFR2(Tyr1214), NRP1 and NRP2 proteins by IHC in our series of NSCLC (Supplementary Table 3) and to search for potential correlation with VEGF-A_{total} and VEGF_{165b}. Unfortunately, we were not able to assess the status of P-VEGFR2(Tyr1214) as the antibody did not give a specific immunostaining. We found significant associations between VEGF_{165b} and P-VEGFR1(Tyr1213) (p=0.0061, Chi2 test) or VEGF_{165b} and NRP2 (p=0.0215, Chi2Test) protein levels (Table 1). These results were confirmed by using the

Spearman correlation ($p=0.0041$ and $p=0.006$ respectively; Supplementary Figure 4). In addition, although less significant, an association between VEGF_{165b} and NRP1 scores was found ($p=0.0128$, Supplementary Figure 4C). In contrast, only a significant association between VEGF-A_{total} and VEGFR2 scores was observed ($p=0.0022$ Spearman correlation; data not shown), which was consistent with recent published data (31). Taken together, these data revealed that high levels of VEGF_{165b} correlate with the accumulation of P-VEGFR1(Tyr1213), NRP2 and to a less extent of NRP1 proteins in NSCLC, which is in agreement with our in vitro data (Figure 3).

Bevacizumab treatment used alone or in combination with chemotherapies increases VEGF_{165b} protein expression that prevents cisplatin-induced apoptosis

Having identified an invasive autocrine role of VEGF_{165b} in NSCLCs, we then asked whether anti-angiogenic therapies might impact on this loop. We first focused on Bevacizumab (BVZ) which is used in clinic for treating lung adenocarcinoma patients and has been shown to bind both VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms. As shown in Figure 4A, treating cells with BVZ increased cellular proliferation. This effect was prevented by specific knock-down of VEGF_{165b} using siRNA (Figure 4B). Importantly, treating cells with BVZ also induced a dose-dependent accumulation of VEGF_{165b} protein level, as detected by ELISA in both intra-cellular extracts and supernatants (Figure 4C) or by western blotting (data not shown). In contrast, intra-cellular amount of VEGF-A_{total} decreased in BVZ-treated cells (Figure 4C). This effect was not restricted to BVZ as SU5416, a VEGFR tyrosine kinase inhibitor, also up-regulated intra-cellular VEGF_{165b} protein level (Figure 4D). Taken together, these data indicated that anti-angiogenic therapies increase the VEGF_{165b}:VEGF-A_{total} ratio. BVZ is currently used in combination with platinum salts. Importantly, we further provided evidence

that cisplatin increases the expression level of VEGF_{165b} in ADC cell lines while decreases VEGF-A_{total} expression (Figure 4E). More interestingly, VEGF_{165b} protein expression was stronger increased in cells co-treated with cisplatin and BVZ compared to cells treated with a single agent (Figure 4E). Again, intra-cellular VEGF-A_{total} protein level was found to decrease upon combined cisplatin/BVZ treatment (Figure 4E). Furthermore, specific neutralization of VEGF_{165b} by using siRNA increased apoptosis occurrence in cisplatin-treated cells (Figure 4F), suggesting that VEGF_{165b} could act as an inhibitor of apoptosis. Consistently, cells overexpressing VEGF_{165b} were more resistant to cisplatin-induced apoptosis (Supplementary Figure 5A) and the neutralization of VEGF_{165b} by the use of a neutralizing anti-VEGF_{165b} antibody increased cells sensitivity to cisplatin (Supplementary Figure 5B). Similar data were obtained when using SU5416. Cells overexpressing VEGF_{165b} were more resistant to SU5416-induced apoptosis (Supplementary Figure 5C) and supernatants from these cells also prevented apoptosis of control cells (Supplementary Figure 5D). Overall, these results indicate that the upregulation of VEGF_{165b} protein level in response to anti-angiogenic therapies used alone or in combination with chemotherapies could promote tumor cells escape from apoptosis.

Bevacizumab triggers a more invasive phenotype in NSCLC cells through the regulation of VEGF_{165b}

Based on the above data, we asked whether BVZ activates the VEGF_{165b}-dependent autocrine loop in NSCLC cells. Treating H358 cells with increasing amount of BVZ increased P-VEGFR1(Tyr1213), P-VEGFR2(Tyr1054/1059), P-VEGFR2(Tyr1214), NRP1, NRP2 and phospho-p38MAPK protein levels (Figure 5A). Of note, such accumulation also correlated with increased expression of both VEGFR1 and VEGFR2 mRNA levels in BVZ treated cells

(data not shown). Similar activation of VEGFR-signaling pathways was observed in H1299 cells (Supplementary Figure 6). More importantly, in both cellular models, the knock-down of VEGF_{165b} by siRNA prevented such activation (Figure 5A and Supplementary Figure 6). Furthermore, cells treated with BVZ for a long period (one week) displayed epithelial to mesenchymal transition features, as detected by the acquisition of some EMT markers such as N-cadherin, vimentin, fibronectin and α -SMA proteins (Figure 5B). Although less pronounced after 3 days of BVZ treatment, the increase of some of these EMT markers in H1299 cells was partially prevented by the specific knock-down of VEGF_{165b} (Figure 5C). Moreover, we observed an increased secretion of active MMP9 metalloprotease in the supernatants of BVZ-treated cells (Figure 5D). Overall, these data demonstrated that BVZ triggers a more invasive phenotype in NSCLC cell lines, through the activation of a VEGF_{165b}-dependent autocrine loop.

VEGF_{165b}-dependent autocrine loop controls growth of NSCLC xenografts in nude mice

Finally, we designed a set of *in vivo* experiments to validate our *in vitro* data. In order to confirm that VEGF_{165b} is required for tumor growth, we first tested the consequences of VEGF_{165b} overexpression. In normal epithelial cells, it has been shown that the splicing factor SRSF6 (former SRp55) controls the VEGF_{xxx}b:VEGF_{xxx} ratio in favor of the VEGF_{xxx}b isoforms (32). We generated stable clones derived from H358 cells stably overexpressing SRSF6 and confirmed the up- or down-regulation of VEGF_{165b} and pan-VEGF, respectively (Figure 6A). In addition, HUVEC cells cultured in medium obtained from SRSF6-overexpressing cells were unable to form tubes in matrigel as compared to cells cultured in medium from control cells, that was consistent with the anti-angiogenic properties of VEGF_{165b} (Figure 6B). Of note, the expression level of VEGF_{165b} in SRSF6 stable clones

(350 pg/mg protein) was well in the range we obtained following Bevacizumab treatment (Figure 4C). This observation explains why we used these clones rather than the H358-VEGF_{165b} cells that express supra-physiologic doses of VEGF_{165b} (Figure 2A). Consistent with our in vitro data, we observed that xenografts from SRSF6-overexpressing cells grow faster and display higher molecular weight than control tumors (Figures 6C and 6D). This effect was not associated with variation in microvascular density, as CD31 or α -SMA endothelial stainings of neovessels were not significantly different (data not shown). Therefore, these data suggested that VEGF_{165b} could promote tumor growth in xenografts from NSCLC cells.

As SRSF6-overexpressing cells likely express growth factors other than VEGF_{165b}, we set-up a reverse experiment in order to specifically knock-down VEGF_{165b} protein level by using siRNA. In addition, we assessed the effect of Bevacuzimab in this setting. To do this, H358 cells were sub-cutaneously injected into nude mice and allowed to form tumors. When tumors reached around 30-40 mm³, mice were sub-divided in 4 groups that received either PBS + *mismatch* [mismatch] or PBS + VEGF_{165b} [si165b] or BVZ + *mismatch* siRNA [BVZ] or BVZ + *VEGF_{165b}* siRNA [BVZ + si165b]. Mice were sacrificed at day 59. As compared to control xenografts, we first observed that tumors deprived of VEGF_{165b} exhibit smaller volumes (Figure 6E). Consistently, these tumors displayed less KI67, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2 or NRP2 protein expression than control tumors, as detected by immunohistochemistry (Figure 6F). Again, no significant difference in term of CD31 or α -SMA endothelial immunostainings was observed between each group (data not shown), thereby suggesting that decreased tumor cell proliferation rather than modulation of angiogenesis could be involved in the effects of *VEGF_{165b}* siRNAs. We also showed that treatment of xenografts with Bevacizumab has no significant effect on tumor volumes compared to control (Figure 6E). Nevertheless, when Bevacuzimab-treated tumors were

immunostained for same markers, we found that they display increased KI67, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2, NRP2 or VEGF_{165b} immunostainings as compared to control xenografts (Figure 6F). More importantly, such increase was significantly prevented when VEGF_{165b} was specifically knocked-down in BVZ-treated xenografts (Figure 6F). In addition, some BVZ-treated xenografts exhibited less E-cadherin than control xenografts, an effect that was also prevented by the neutralisation of VEGF_{165b} (Figure 6G). Taken together, these results supported the evidence that VEGF_{165b} activates a VEGFR-dependent autocrine loop that overcomes its anti-angiogenic functions to promote NSCLCs tumor growth in vivo. Importantly, Bevacizumab seems able to activate such a loop.

Discussion

Although it is known since two decades that VEGF-A is highly regulated by pre-mRNA alternative splicing, the role of each specific splice variant in tumor progression and response to angiogenic therapies remains largely unknown. This is particularly true when considering the autocrine function of VEGF-A on tumor cells themselves. However, such investigations are required especially in light of some recent data unravelling the VEGF₁₂₁ and VEGF_{165b} isoforms as potential biomarkers of the response to Bevacizumab treatment in cancer (5, 27). We previously demonstrated that the transcription factor E2F1 inhibits neo-angiogenesis in lung adenocarcinoma xenografts through the up-regulation of VEGF_{165b} (28). In this paper, we unravel an unexpected function of VEGF_{165b} in controlling an invasive

VEGFR1/VEGFR2 autocrine loop that could overcome its antiangiogenic properties and be involved in NSCLC progression and escape to Bevacizumab treatment.

We describe for the first time a differential pattern of expression of the VEGF₁₆₅b protein in NSCLCs, with patients exhibiting low or high VEGF₁₆₅b protein levels as compared to normal lung tissues. Importantly, we found that high levels of VEGF₁₆₅b correlate with lymph node metastases in NSCLCs, unraveling an unexpected association of this isoform with lung tumor progression. In agreement, lung adenocarcinoma cell lines overexpressing VEGF₁₆₅b exhibited a more aggressive phenotype evidenced by increased proliferation, migration and secretion of metalloproteases, as compared to control cells. Despite being able to bind both VEGFR1 and VEGFR2 receptors with the same affinity than VEGF₁₆₅, VEGF₁₆₅b lacks a neuropilin-1 binding site and is less effective in promoting VEGFR2 phosphorylation, activation and recycling to the plasma membrane in endothelial cells (33). Nevertheless, we demonstrated that rhVEGF₁₆₅b triggers a sustained activation of both VEGFR1 and VEGFR2 receptors in lung adenocarcinoma cell lines that correlates with p38MAPK activation, cellular proliferation and the acquisition of some EMT markers such as vimentin and fibronectin. In addition, the specific knock-down of VEGF₁₆₅b by siRNA slows-down the growth of NSCLC tumor cells xenografted into nude mice, that was correlated with a decrease in P-VEGFR1(Tyr1213) and VEGFR2 tumoral immunostainings. As we did not observe significant difference in term of CD31 or α -SMA endothelial stainings in VEGF₁₆₅b knocked-down compared to control xenografts, our data highly suggest that autocrine rather than paracrine functions of VEGF₁₆₅b control NSCLC tumor growth. Importantly, such autocrine function appears to be relevant *in situ* as we found a significant association between high levels of VEGF₁₆₅b and P-VEGFR1(Tyr1213) in tumors ($p=0.0061$, Chi2 test). Interestingly, we also found that rhVEGF₁₆₅b increases NRP1 and/or NRP2 mRNA and protein levels *in*

vitro (Figure 3D and data not shown). Again, these data were validated in primary tumors (Supplementary Figure 4 and Table 1). Therefore, it remains to be determined whether NRP1 and/or NRP2 play a role in the VEGF₁₆₅b-dependent activation of VEGFR1/VEGFR2 in our cellular models. Of note, we also found a significant association between P-VEGFR1(Tyr1213) and NRP2 (p=0.0049) as well as between VEGFR2 and NRP2 (p=0.0049) scores, thereby suggesting an important role of NRP2 in VEGFR1/VEGFR2-dependent signaling pathways in NSCLCs.

Our results are in contrast with previous data demonstrating that downregulation of VEGF₁₆₅b rather than upregulation is associated with advanced stages, vascular invasion, and metastases (18, 20, 25, 34) and that VEGF₁₆₅b overexpression slow-downs the growth of tumor cells xenografted into nude mice through inhibition of tumor neovascularization (24, 26, 35). On the other hand, our results fit well with other studies demonstrating that VEGF_{xxx}b isoforms are not always down-regulated in tumors (36) and that VEGF_{xxx}b protein levels are significantly higher in infiltrating ductal breast carcinomas (37). In addition, they are highly consistent with the observation made in xenografts in nude mice by Catena and co-workers who showed that stable overexpression of VEGF₁₆₅b protein in A549 human lung adenocarcinoma cells results in a significant increase in tumor development over the controls, although no significant differences in vascular density were found (37). Therefore, the role of VEGF₁₆₅b during tumorigenesis might be more complex than previously thought and might depend on the cellular context (for instance the presence of NRP1, NRP2 or the amount of VEGFR1 or VEGFR2), as well as on its autocrine or paracrine functions on tumor and endothelial cells. In addition, the ratio between the different VEGF-A splice variants might also play a crucial role in the regulation of the autocrine loop in NSCLCs. Indeed, we unravel an unexpected apoptotic function of the VEGF₁₆₅ isoform in lung adenocarcinoma cell lines, that we never

observed upon VEGF₁₈₉ or VEGF₁₂₁ treatment. These data confirm in lung tumor the existence of anti-invasive functions of the VEGF₁₆₅ isoform on tumor cells, as recently reported in glioblastoma (14). They also lead to the postulate that VEGF_{xxx} splice variants other than VEGF₁₆₅ could be overexpressed in NSCLC tumors.

Identification of predictive biomarkers of response to anti-angiogenic therapies, such as Bevacizumab, is a crucial issue. In this setting, considering the impact of these therapies on tumor cells themselves could provide some clues, especially as they were initially developed to target endothelial cells only. As an example, in glioblastoma tumor cells, Bevacizumab was found to upregulate the tyrosine kinase c-Met that was later involved in tumor invasion and recurrence (38, 39). In this study, we found that Bevacizumab with or without platinum salts increases specifically the VEGF₁₆₅b expression levels in lung tumor cells and activates a VEGFR1/VEGFR2/VEGF₁₆₅b-dependent autocrine loop, that triggers a more invasive phenotype. Importantly, although Bevacizumab did not significantly affect the growth of NSCLC xenografts in nude mice, it increased the expression level of VEGF₁₆₅b and promoted the accumulation of P-VEGFR1(Tyr1213) and VEGFR2 proteins in a VEGF₁₆₅b-dependent manner. Therefore, one might suggest that the accumulation of VEGF₁₆₅b by BVZ could contribute to the selection of tumor cells with a more aggressive phenotype. In this setting, it is interesting to notice that squamous lung carcinoma, that are not eligible to Bevacizumab treatment, are those that express the higher VEGF₁₆₅b:VEGF-A_{total} ratios. We are currently investigating the role of VEGF₁₆₅b in that case. In metastatic colorectal cancers, several hypotheses have been proffered regarding VEGF₁₆₅b potential as a predictive biomarker for bevacizumab response (27). First, it has been proposed that the concentration of effective bevacizumab could be lowered in patients with higher VEGF₁₆₅b concentrations, as most of

the antibody is bound to VEGF₁₆₅b, thereby diminishing the anti-angiogenic activity of VEGF₁₆₅b while increasing the amount of free pro-angiogenic VEGF₁₆₅. Conversely, patients with lower VEGF₁₆₅b levels may have a more angiogenic-progressive tumor than the high VEGF₁₆₅b group, thereby rendering the tumor more susceptible to bevacizumab + FOLFOX. This more angiogenic profile could also explain why patients with higher levels of soluble VEGF₁₂₁ are more susceptible to bevacizumab, as this diffusible short isoform might more accurately reflect the levels of bioactive VEGF-A and the vascular dependence of the tumor. In this study, we propose an alternative mechanism of resistance to BVZ in NSCLCs involving a VEGF₁₆₅b-dependent invasive VEGFR1/VEGFR2 autocrine loop. In this context, as we also evidence an anti-apoptotic function of VEGF₁₆₅b in response to cisplatin, combination of Bevacizumab and platinum salts that is a common treatment for lung ADC patients might further enhance tumor escape.

Therefore, reminiscent of their antagonistic functions on endothelial cells, both VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅b splice variants appear to play antagonistic roles on NSCLC tumor cells also. These data reinforce the need for a better understanding of the contribution of each VEGF-A splice variant during the tumorigenic process, but also requires consideration of their respective status when investigating the global response to anti-angiogenic treatments.

Methods

Patients, tissue samples and immunohistochemistry

Seventy four human Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) and 16 matched normal lung parenchymas were included in this study. Tumors consisted of 38 adenocarcinomas and 36 squamous cell lung carcinomas (Table 1). Tissue samples were collected from resection of lung tumors, and stored for scientific research in a biological resource repository (Centre de Ressources Biologiques, CHU Albert Michallon, Grenoble Hospital). National ethical guidelines were followed. All patients enrolled in this trial provided written informed consent. Tissue banking and research conduct was approved by the Ministry of Research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud Est). Tumor tissues and normal lung parenchyma taken at distance from the bulk of the tumor were immediately frozen and stored at -80°C until use. For histological classification, tumor samples were fixed in formalin, and diagnosis was made on paraffin-embedded material using the 2004 WHO classification of lung criteria (40). For each case, one section from the most representative block was chosen. These sections always contained more than 70% of tumor cells. Antibodies and techniques used for immunohistochemistry are described in details in Supplementary Methods section.

Cell culture, transfection, wound healing, invasion and tubulogenesis assays

Human lung adenocarcinoma cell lines (H358, H1299) were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine and 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) as previously described (41, 42). Stable SRSF6 and VEGF₁₆₅b clones derived from H358 or H1299 cells were obtained after transfection using Fugene® 6 reagent (Roche Diagnostic, France) with either pcDNA3 empty vector or pcDNA3-SRSF6-myc or pcDNA3-VEGF₁₆₅b encoding plasmids. Transfected cells were selected for at least 4 weeks using

800µg/mL geneticin (G418). Single colonies were isolated and expended for further analyses. Two representative VEGF₁₆₅b-overexpressing clones are illustrated for H358 (clones 13 and 36) and H1299 (clones 2 and 5) cells. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cells were cultured using EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176, LONZA). Bevacizumab (Avastin®) was provided by Roche/Genentech, Indianapolis, IN, USA. SU5416 was purchased from Sigma-Aldrich (cat# S8442). Cisplatin was purchased from Calbiochem (cat#232120). Recombinant VEGF₁₆₅b (cat#DY3045) and VEGF₁₆₅ (cat# DVE00) proteins were from R&D systems. Apoptosis, cytotoxic, wound-healing, cell invasion and tubulogenesis assays were performed as previously described (41, 42) and are described more in details in the Supplementary Methods section.

RNA interference

Small interfering RNA (siRNA) and control non-targeting siRNA (mismatch) were purchased from Eurogentec (Liege Science Park, Belgium). The siRNA targeting specifically VEGF₁₆₅b was: forward, 5'-GAACGUACUUGCAGAUCUCUCTT-3'; reverse, 5'-GAGAGAUCUGCAAGUACGUUCTT-3'. The sequences for NRP1 siRNA were designed as forward, 5'-GAGAGGUCCUGAAUGUCCTT-3'; reverse, 5'-GGAACAUUCAGGACCUCUCTT-3'. The sequences for NRP2 siRNA were designed as forward, 5'-AAAGGCUGGAAGUCAGCACUAAUUUTT-3'; reverse, 5'-AAAAAUUAGUGCUGACUUCCAGCUUTT-3'. The scrambled siRNA oligonucleotides used as a control for all RNA interference experiments were as follows: forward 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAATT-3' and reverse 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Transfection was performed using OligofectamineTM reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were analysed 72 hours post-transfection. The sequence for

control siRNA used in *in vivo* experiments was designed as forward, 5'-CUUACGCUCACUACUGCGATT-3'; reverse, 5'-UCGCAGUAGUGAGCGUAA-GTT-3'.

Antibodies and immunoblotting

Immunoblotting experiments were done as previously described (43). The antibodies used were: anti-VEGF_{165b} (MAB3045) from R&D Systems, anti-myc (clone 9E10, sc-40), anti-VEGF-A (A20, sc-152), anti-neuropilin-2 (clone C-9, sc-13117) from Santa Cruz, anti-alpha-p38 MAPK-Thr180/Tyr182 (MABS64, clone 6E5.2) and anti-phospho-VEGFR1-Tyr1213 (cat#07-758) from Millipore, anti-phospho-VEGFR2-Tyr1214 (44-1052) from Invitrogen, anti-VEGFR2 (mAB2479, clone 55B11), anti-actin (mAB8456), anti-AKT (mAB9272), anti-phospho-AKT-Ser473 (mAB4060, clone D9E), anti-active caspase-3 (mAB9661), anti-phospho-ERK1/2-Thr202/Tyr204 (mAB9106) and anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (mAB9102) from Cell Signaling, anti-SNAIL (ab63371), anti-phospho-VEGFR2-Tyr1054/1059 (ab5473) and anti-neuropilin-1 (ab81321) from Abcam, anti-SRSF2 (4F11) from Euromedex, anti-tubulin from TEBU, anti-N-cadherin (32/N-Cadherin) and anti-E-cadherin (36/E-Cadherin) from BD Biosciences, anti-vimentin (V6630, clone V9) and anti-fibronectin (clone FN-15) from Sigma.

Zymography

Medium was collected from cultured cells in order to analyze the activity of MMP9 using gelatin zymography. Cells were cultured in Petri dishes until confluence. For each condition, gelatin gels were loaded with sample mixed with sample buffer [0.03% bromophenol blue, 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS (w/v) and 4% saccharose (w/v)]. Electrophoresis was performed on 10% polyacrylamide gels containing 1% (w/v) of gelatin (Sigma) at 80V, under

non-reducing conditions. Gels were washed twice in 2.5% (v/v) Triton X-100, 30 minutes each time, at room temperature, to remove SDS. Then, gels were incubated in a Substrate Reaction Buffer (52mM Tris-HCl pH 7.2, 5mM CaCl₂, 200mM NaCl, 0.01% Triton X-100) for 24 hours. Gels were further stained in Coomassie Blue Staining Solution [0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 10% acetic acid solution and 20% (v/v) methanol] for 30 minutes, and de-stained in a solution containing 20% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Pro-MMP9 and MMP-9 were identified according to their molecular weight.

ELISA assays

ELISA assays were performed on cellular extracts and cellular supernatants using a total amount of 100µg of proteins for each sample. ELISA assay for VEGF_{165b} was performed using R&D system DuoSet ELISA kit (cat#DY3045). ELISA assay for pan-VEGF was performed using the Human VEGF Standard ELISA Development Kit from PeproTech (cat# 900-K10). Each ELISA was performed according to the manufacturer's recommendations.

In vivo studies

All animal experiments were conducted in agreement with the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication n°86-23, revised 1985) and were approved by a regional ethics committee. Female athymic Swiss nude mice were purchased from Janvier (Le Genest-Isle, France). In all experiments, 20x10⁶ H358 control cells or H358-SRSF6 overexpressing cells were injected sub-cutaneously into nude mice. The tumor volumes were measured once a week in two perpendicular diameters and calculated as follows: $a \times b^2 \times 0.4$, where "a" and "b" are the largest and smallest diameters, respectively. Mice were sacrificed at different time

points and tumors were analyzed by western blotting and/or immunohistochemistry in the same conditions than for human NSCLC tissues. Vascularisation of tumor samples was assessed by measuring the amount of haemoglobin in RIPA extracts using Drabkin's reagent (Sigma). The results were normalized relative to the amount of protein in each sample. Statistical analysis of tumor volumes between groups was performed using a non parametric Mann-Whitney t test (at least 7 animals per group).

In a second experiment, 20×10^6 H358 cells were implanted sub-cutaneously in nude mice and allowed to form tumors for 3-4 weeks. When tumor volumes reached $30\text{-}40\text{mm}^3$, mice were divided into 4 groups (10 mice each) and were alternatively SC- or IP-injected four times a week, with either *mismatch* siRNA as a control or *VEGF_{165b}* siRNA ($16\mu\text{g}/\text{mice}$). Once a week, siRNAs were combined with either BVZ ($7.5\text{mg}/\text{kg}$) or PBS as a treatment control. Transfection of siRNA was performed using in vivo-jetPEI™-Gal (cat#202-10G, Polyplus-transfection). Tumor volumes were monitored throughout the experiment as described above. Mice were sacrificed after 8 weeks of treatment, tumors were removed, weighted, washed, fixed in Buffered Formaldehyde and processed for immunohistochemical analysis as previously detailed.

References

1. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
2. Ferrara N, Mass RD, Campa C, Kim R. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. *Annu Rev Med* 2007;58:491-504.
3. Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:179-213.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
5. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol* 2013;31:1219-30.
6. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
7. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-50.
8. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013;13:871-82.
9. Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol* 2003;200:336-47.

10. Bachelder RE, Crago A, Chung J, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61:5736-40.
11. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 2002;62:7203-6.
12. Goel HL, Chang C, Pursell B, et al. VEGF/neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-IR define a novel mechanism of aggressive prostate cancer. *Cancer Discov* 2012;2:906-21.
13. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010;140:268-79.
14. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 2012;22:21-35.
15. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, et al. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012;30:1129-36.
16. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-65.
17. Rugo HS. Inhibiting angiogenesis in breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *J Clin Oncol* 2012;30:898-901.
18. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.

19. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007;249:133-42.
20. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004;64:7822-35.
21. Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2009;37:1207-13.
22. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 2008;68:4683-92.
23. Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2067-77.
24. Rennel E, Waite E, Guan H, et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008;98:1250-7.
25. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007;97:223-30.
26. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, et al. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008;98:1366-79.
27. Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE, et al. Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2012;18:6384-91.

28. Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, et al. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene* 2010;29:5392-403.
29. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005;48:2422-7.
30. Bevan HS, van den Akker NM, Qiu Y, et al. The alternatively spliced anti-angiogenic family of VEGF isoforms VEGF_{xxx}b in human kidney development. *Nephron Physiol* 2008;110:p57-67.
31. Chatterjee S, Heukamp LC, Siobal M, et al. Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J Clin Invest* 2013;123:1732-40.
32. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008;121:3487-95.
33. Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 2011;118:816-26.
34. Diaz R, Pena C, Silva J, et al. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF₁₆₅b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF₁₆₅b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* 2008;123:1060-7.
35. Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, et al. Recombinant human VEGF₁₆₅b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer* 2008;44:1883-94.

36. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, et al. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 2012;31:1683-94.
37. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, et al. VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 2010;9:320.
38. Jahangiri A, De Lay M, Miller LM, et al. Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res* 2013;19:1773-83.
39. McCarty JH. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy: has the challenge been MET? *Clin Cancer Res* 2013;19:1631-3.
40. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 2005;40:90-7.
41. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene* 2007; 26:6927-36.
42. Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, et al. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* 2008; 15:1815-23.
43. Salon C, Eymin B, Micheau O, et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* 2006;13:260-72.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Sophie Michallet, Floriane Albert and Virgine Rouyre for technical assistance. We thank Laurence David-Boudet and Adrien Mombrun for IHC performance. We thank Denis Moro-Sibilot and Philippe Lorimier for tumor bank gestion and data retrieving. This work was supported by the Comité Départemental Isère and Comité Départemental Savoie de la Ligue Nationale contre le Cancer, by the INCa/DHOS (Appel d'Offre Recherche Translationnelle 2010), by the Fondation de France (Projet Grande Ampleur), by ROCHE fellowship (Bourse de Recherche Fondamentale) and by the Fondation ARC pour la Recherche Contre le Cancer. Stephanie Gout was supported by a post-doctoral fellowship from Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer. Asma Boudria, Stephanie Gout and Beatrice Eymin contributed to conception, acquisition and interpretation of data. Asma Boudria and Stephanie Gout performed the transfection, cytotoxic assays and western blot analyses. Elisabeth Brambilla and Sylvie Lantuejoul contributed to acquisition, analysis and interpretation of the IHC data. Asma Boudria, Elisabeth Brambilla, Sylvie Lantuejoul, Sylvie Gazzeri and Beatrice Eymin drafted the article and revised it critically for intellectual content.

Legends to the Figures

Figure 1. Expression of VEGF₁₆₅b protein in NSCLCs. (A,B) Representative immunostainings from paraffin-embedded section of (A) lung adenocarcinoma or (B) squamous cell lung carcinoma with VEGF₁₆₅b antibody. Histograms distribution of VEGF₁₆₅b scores for each tumor case are presented in right panels. (C) Distribution of frequency of the VEGF₁₆₅b:VEGF_{total} ratio according to each histological sub-type. (D) Distribution of the VEGF₁₆₅b scores according to the nodal status. Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test.

Figure 2. VEGF₁₆₅b-overexpressing cells display a more invasive phenotype. Stable clones derived from H358 and H1299 human lung adenocarcinoma cell lines overexpressing VEGF₁₆₅b were generated. For each cell line, two representative clones were selected (clones 13 and 36 for H358, clones 2 and 5 for H1299). (A) Clones overexpressing VEGF₁₆₅b were characterized by measuring intra-cellular levels of VEGF₁₆₅b by ELISA assay. (B) Cell number was estimated at indicated times in clones and controls following trypan blue staining. The means \pm SD of three independent experiments are illustrated (C) H358 and H1299 native cells were cultured with supernatants from control H358 or H1299 cells or with supernatants from VEGF₁₆₅b-overexpressing cells as indicated. Cell number was estimated by counting cells following trypan blue staining. (D) Wound healing assay was performed using control and VEGF₁₆₅b-overexpressing H1299 cells (clones 5 and 2). Scratch recover was estimated after 13 hours. Lower panel represents the scratch coverage percentage. (E) Boyden chamber assay was performed in control and VEGF₁₆₅b-overexpressing H358 cells using serum gradient and β -FGF as attractants. Migration was quantified after counting the number of transmigrating cells stained with Hoechst. (F) The ability of VEGF₁₆₅b-overexpressing

H1299 clones to secrete active metalloproteases (MMPs) was tested by gelatin zymography. The supernatant from HT1080 cell line was used as a control for MMPs activation.

Figure 3. rhVEGF₁₆₅ and rhVEGF_{165b} recombinant ligands exhibit distinct autocrine functions in NSCLCs. (A) Cells were treated or not with 0.01 ng/ml of either rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF_{165b} recombinant ligand during 72 hours and counted following trypan blue staining. (B) Cells were transfected with either *mismatch* or *VEGF_{165b}* siRNA for 72 hours and counted following trypan blue staining. Western blot analysis using anti-VEGF_{165b} or anti-panVEGF antibody was performed to assess the specific knock-down of VEGF_{165b}. Tubulin was used as a loading control. (C) Cells were treated or not (NT) with 0.01 ng/ml of either rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF_{165b} recombinant ligand during 72 hours. Apoptosis was evaluated following Hoechst staining. Activation of procaspase-3 was studied by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (D, E) H358 cells were treated or not with either 0.01 ng/ml rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF_{165b} for 72 hours (D) or 6 days (E). Western blot analysis was performed using the indicated antibodies. Actin was used as a loading control.

Figure 4. Anti-angiogenic therapies used alone or in combination increase the VEGF_{165b} protein level that prevents apoptosis. (A) Cells were treated or not with 50 µg/ml Bevacizumab (BVZ) at the indicated times and counted upon trypan blue staining. Means ± SD of 3 independent experiments are presented. (B) Cells were transfected for 48 hours either with *mismatch* or *VEGF_{165b}* siRNA and treated for 24 additional hours with 50 µg/ml BVZ. Cells were counted upon trypan blue staining. (C) ELISA assays for VEGF_{165b} and VEGF-A_{Total} were performed either in intra-cellular extracts (left panels) or in supernatants (right panels) of H358 cells treated or not (NT) with increasing concentrations of BVZ during 72

hours. (D) H358 cells were treated or not (NT) with increasing concentrations of SU5416 during 48 hours as indicated. ELISA assays for VEGF_{165b} and VEGF-A_{Total} detection were performed on intra-cellular cell extracts. (E) Cells were treated or not (NT) for 72 hours with either 5 μ M cisplatin or a combination of 5 μ M cisplatin and 1 μ g/ml BVZ. ELISA assays were performed in intracellular extracts as described above. (F) Cells were transfected for 48 hours with either *mismatch* or *VEGF_{165b}* siRNA and incubated for 24 additional hours with 50 μ M cisplatin. Apoptosis was quantified by flow cytometry using an anti active-caspase 3 antibody coupled to FITC. The means \pm SD of 3 independent experiments are illustrated. Of note, siRNA specificity and efficiency were verified by western-blotting on total cellular extracts (upper panel for H358 cells, data not shown for H1299 cells).

Figure 5. Bevacizumab activates the VEGF_{165b}-dependent autocrine loop. (A) H358 cells were transfected with either *mismatch* or *VEGF_{165b}* siRNA for 72 hours and incubated or not with increasing doses of BVZ during the same time. A western-blot analysis was performed to assess VEGF_{165b} and VEGF_{total} protein levels, as well as activation of VEGFR1/VEGFR2 signaling pathways using relevant antibodies. Tubulin was used as a loading control. (B) Cells were treated with increasing doses of BVZ during 7 days. Western-blotting was performed to assess EMT status using antibodies against relevant markers. Tubulin was used as a loading control. (C) Western- blotting analysis for EMT markers was performed on total cellular protein fraction from H1299 cells transfected for 72 hours with either *mismatch* or *VEGF_{165b}* siRNA and incubated with increasing doses of BVZ. Actin was used as a loading control. (D) Cells were treated for 72 hours with BVZ until confluence. Then, supernatants were collected and used to perform gelatin zymography. HT1080 supernatant was used as a control for MMPs activation.

Figure 6. VEGF_{165b} activates a VEGFR1/VEGFR2 autocrine loop in H358 xenografts to promote tumor growth. (A) Stable clones derived from the H358 cell line overexpressing the SR protein SRSF6 were generated. The results obtained with a representative clone are illustrated. Upper panel: as detected by western blotting, SRSF6 protein was overexpressed in SRSF6 clones (SRSF6) compared to control clones (Tet-On 4). Tubulin was used as loading control. Lower panel: ELISA assays for quantification of VEGF_{165b} and VEGF-A_{Total} were performed in Tet-On4 and SRSF6 clones. As shown, SRSF6 overexpressing clones express higher levels of VEGF_{165b} than controls. (B) Formation of neotubes from HUVEC cells grown in matrigel was impaired when HUVEC cells were incubated for 8 or 18 hours with supernatants from SRSF6-overexpressing cells, as compared to supernatants from control cells. (C) Control or SRSF6-overexpressing cells were injected sub-cutaneously in nude mice. Tumor growth was assessed by measuring tumors diameter and calculating tumor volumes using the following formula: $a \times b^2 \times 0.4$, where “a” and ”b“ are the largest and smallest diameter respectively. Data are presented as the mean tumor growth \pm SD. As shown, the growth of SRSF6-overexpressing xenografts was accelerated as compared to control xenografts. (D) Left panels: pictures representative of Tet-On and SRSF6 xenografts. Right panel: Distribution of Tet-On 4 and SRSF6 tumor weights around the mean tumor weight. Statistical analyses were performed using a non parametric Mann-Whitney statistical test. *** $p < 0.001$. (E, F) H358 cells were sub-cutaneously injected in nude mice and allow to form tumor during three weeks. At this time, the animals were sub-divided in four groups (n=10 for each group), that either received PBS + *mismatch* siRNA [PBS+mis], or PBS + VEGF_{165b} siRNA [PBS+si165b] or Bevacizumab (7.5 mg/kg) + *mismatch* siRNA [BVZ+mis] or Bevacizumab + VEGF_{165b} siRNA [BVZ+si165b]. Mice bearing tumors were sacrificed at day 59 after the first injection. (E) Histogramms illustrating the mean \pm SD of tumor volumes calculated as described in the material and methods section for each condition at day 43

(black bars) or 59 (white bars) after the first injection. (F, G) Immunohistochemical staining was performed on paraffin embedded sections of tumors using the corresponding antibodies. Representative immunostainings of KI67, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR1, VEGFR2, VEGF-A_{total}, VEGF_{165b}, NRP2 or E-cadherin are presented. One example is illustrated for each condition. Of note, PBS + si165b and BVZ + si165b xenografts display less VEGF_{165b} immunostaining than the two other groups, whereas no significant difference for VEGF-A_{total} immunostaining was observed between the 4 groups. These IHC data confirm the specificity of the VEGF_{165b} knock-down.

Supplementary Legends

Supplementary Figure 1. Expression levels of VEGF_{165b} in normal lung parenchyma.

(A) Distribution of VEGF_{165b} scores as estimated by immunohistochemistry in a series of 16 normal lung parenchymas. (B) Distribution of frequency of the ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total} in normal lung samples.

Supplementary Figure 2. Distribution of the VEGF_{165b}:VEGF_{total} ratio in NSCLC cell lines. ELISA assays were performed in various cell lines derived from lung adenocarcinoma (ADC) or squamous cell lung carcinoma (SCC) to assess the intracellular level of VEGF_{165b} or VEGF_{total}. The VEGF_{165b}:VEGF_{total} ratio is presented for each cell line.

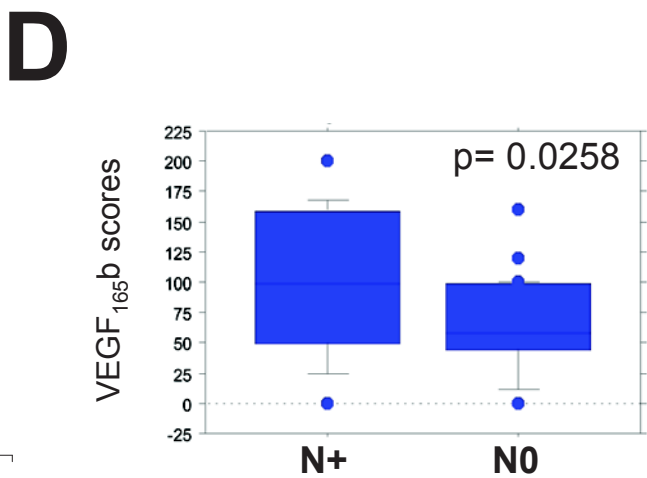
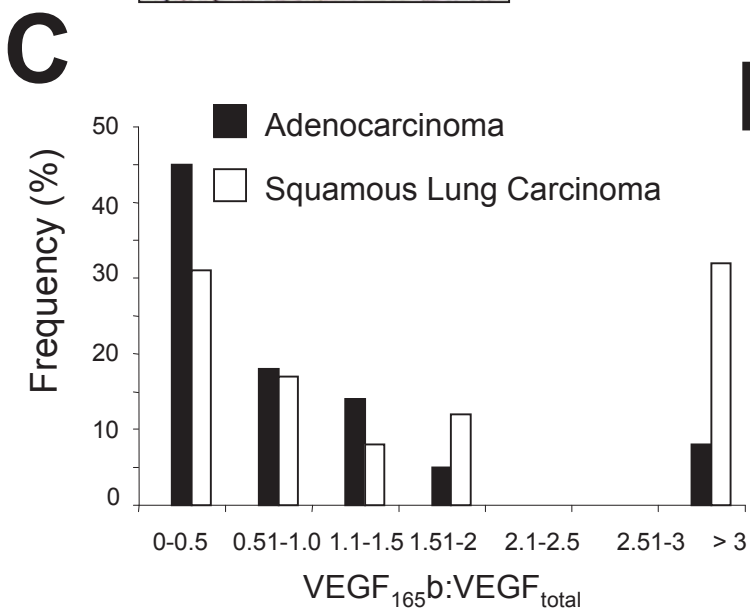
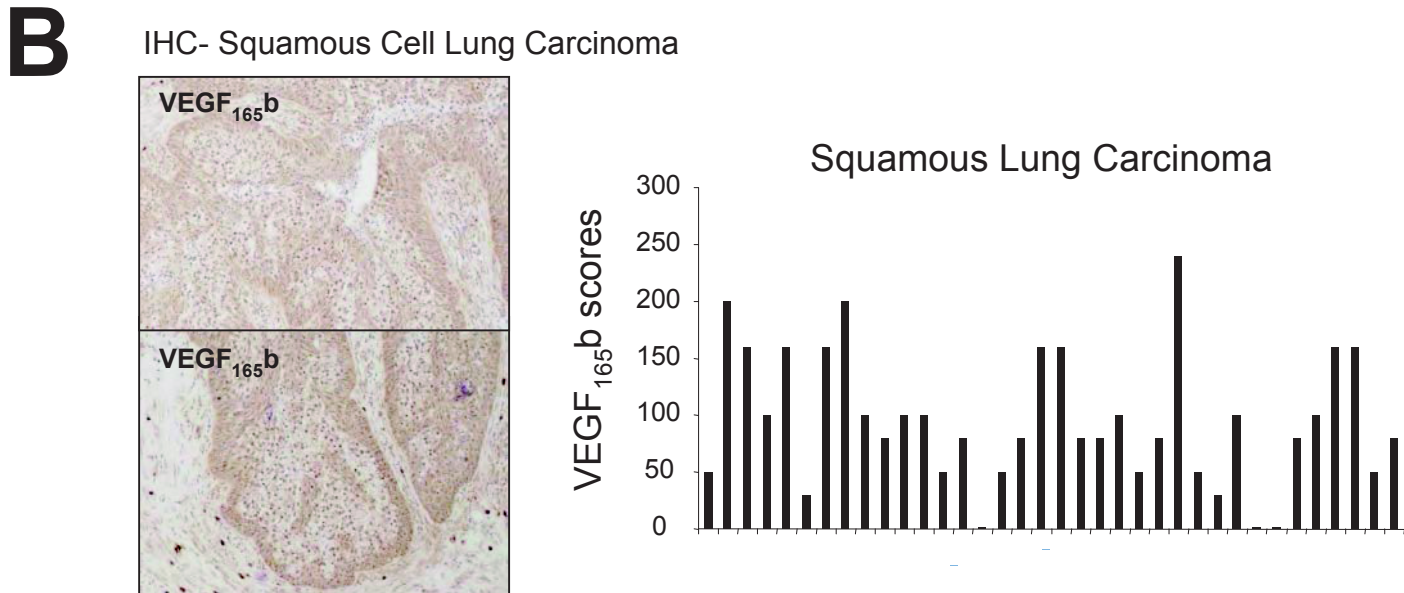
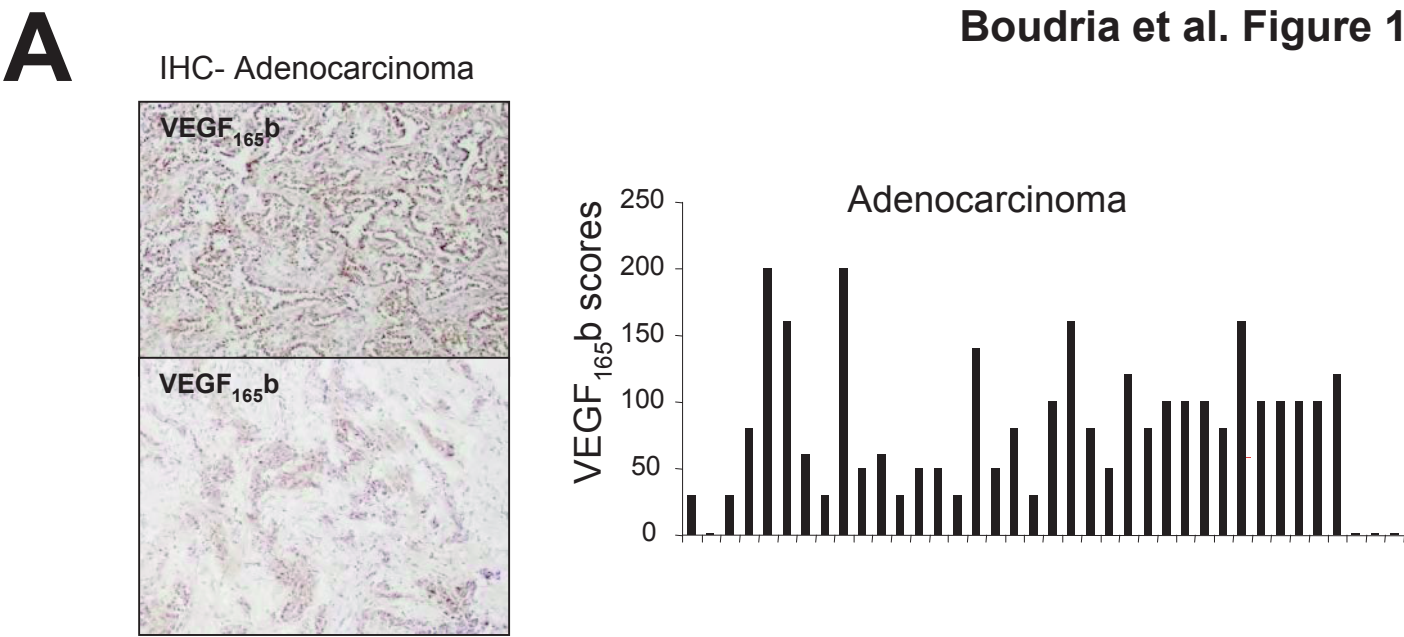
Supplementary Figure 3. rhVEGF_{165b} but not rhVEGF₁₆₅ triggers a sustained phosphorylation of VEGFRs. Cells were incubated or not (untreated) with either 0.01ng/ml rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF_{165b} for 72 hours. Activation of the VEGFR-dependent signaling pathways was assessed by western-blotting using appropriate antibodies.

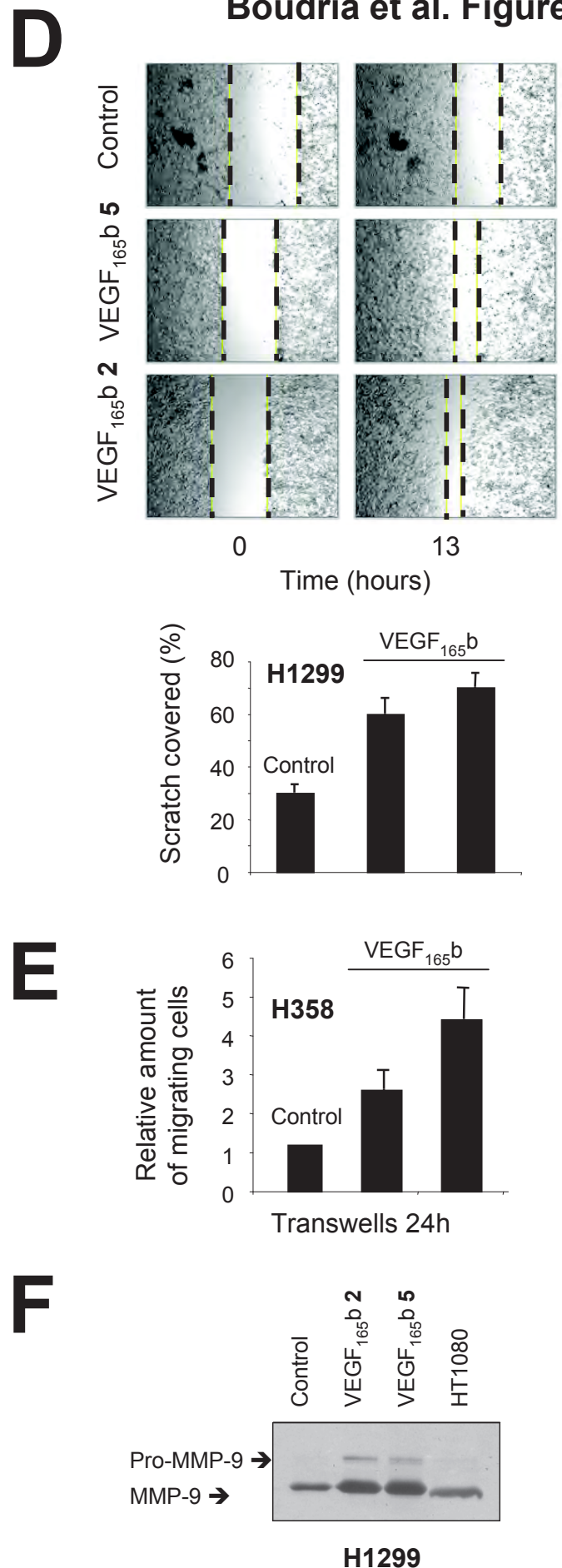
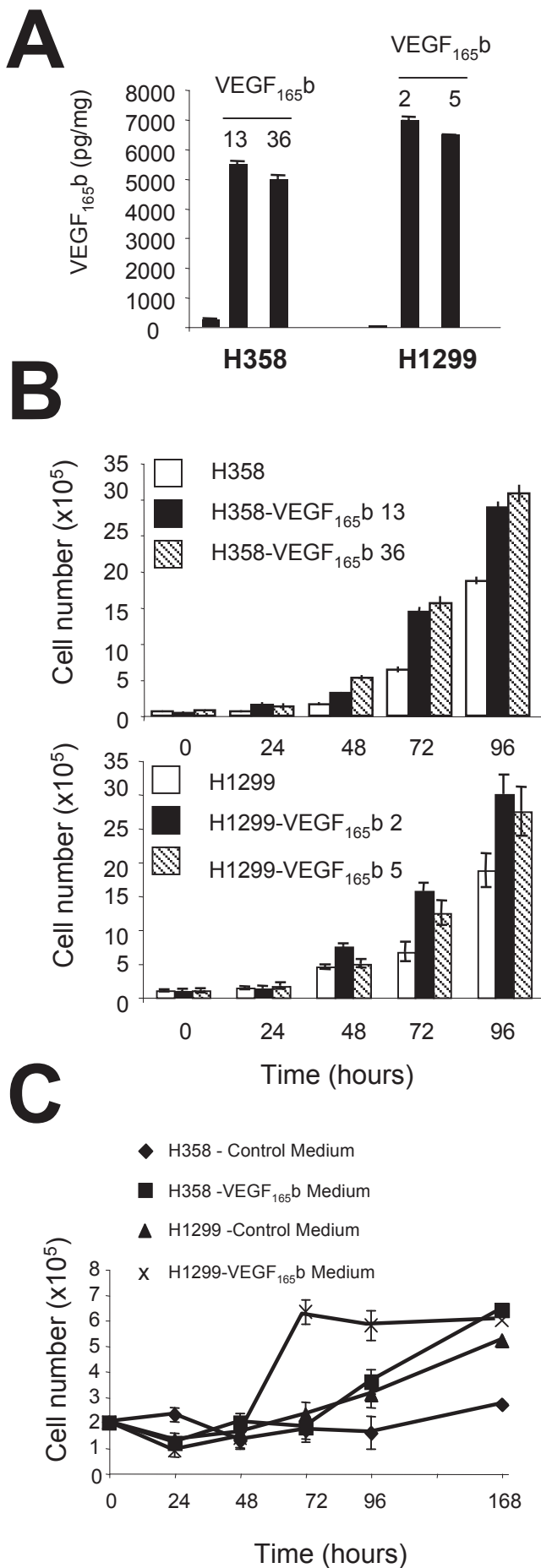
Supplementary Figure 4. High scores of VEGF_{165b} correlate with high scores of P-VEGFR1(Tyr1213), neuropilin-2 and neuropilin-1 in NSCLCs. Distribution of VEGF_{165b} scores according to the phosphorylation of VEGFR1 on its Y1213 (A), the status of neuropilin-2 (NRP2; B) and neuropilin- 1 (NRP1; C), in NSCLCs. Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test.

Supplementary Figure 5. VEGF_{165b} confers resistance to platinum salts and VEGFRs TKI in NSCLC cells. (A) H358 control cells (Luc) or H358 clones overexpressing VEGF_{165b} (VEGF_{165b}) were incubated for 72 hours with either 10 μ M cisplatin or 10 μ g/ml BVZ. Expression of VEGF_{165b}, VEGF-A_{total} and active caspase-3 proteins was determined by western-blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) Upper panel: a 96 hours methylene blue assay was performed in H358 and H1299 cells treated or not with increasing concentrations of cisplatin combined with either an irrelevant IgG as a control (5 μ g/ml) or a neutralizing anti-VEGF_{165b} antibody (5 μ g/ml). Lower panel: as a control, a 96 hours treatment with increasing doses of anti-VEGF_{165b} antibody had no effect on cellular viability in both cell lines as measured by methylene blue assay. (C) H358 control cells and two VEGF_{165b}-overexpressing H358 derived clones (clones 13 and 36) were treated or not for 48 hours with increasing doses of SU5416 as indicated. Apoptosis was evaluated under microscope following Hoechst staining and counting of approximately 500 cells. The results show that cells overexpressing the VEGF_{165b} isoform are more resistant to SU5416-induced apoptosis than controls. (D) Cells were cultured for 24 hours in conditioned medium obtained either from control cells (Co) or from VEGF_{165b}-overexpressing clones (VEGF_{165b} 13 and 36 for H358 or 2 and 5 for H1299), then treated for 24 additional hours with 10 μ M SU5416. Number of apoptotic cells was assessed following Hoechst staining by counting approximately 500 cells.

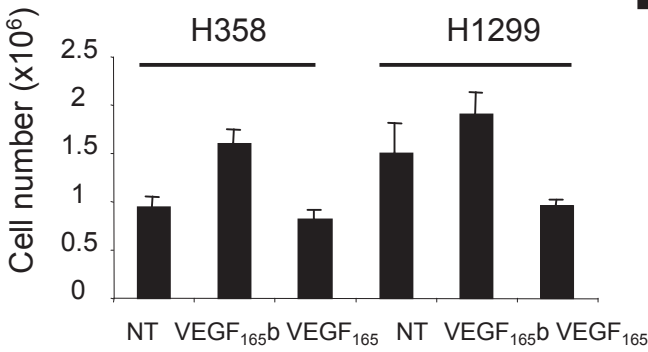
Supplementary Figure 6. VEGF_{165b} silencing inhibits Bevacizumab-induced VEGFRs activation. H1299 cells were transfected either with a *mismatch* siRNA as a control or a siRNA targeting specifically VEGF_{165b} and treated or not (NT) for 72 hours with increasing concentrations of Bevacuzimab as indicated. Western-blot analysis of VEGFRs signaling

pathways was performed on total cellular extracts by using the indicated antibodies. Actin was used as a loading control.

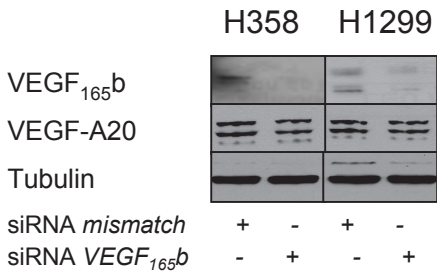




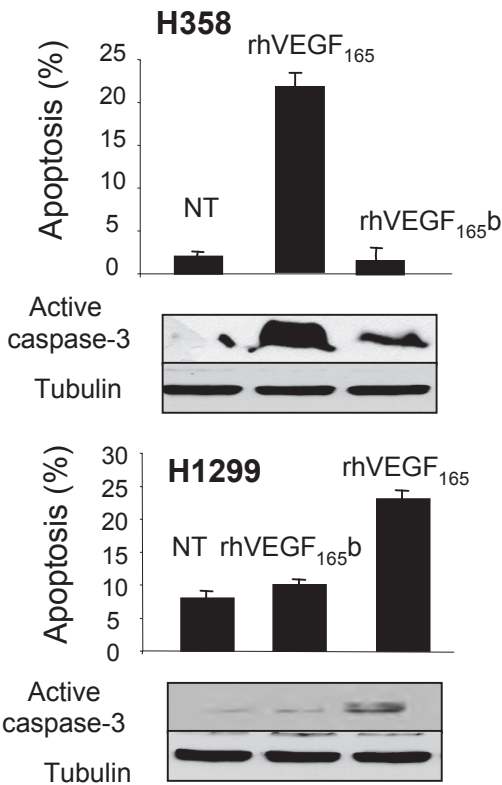
A



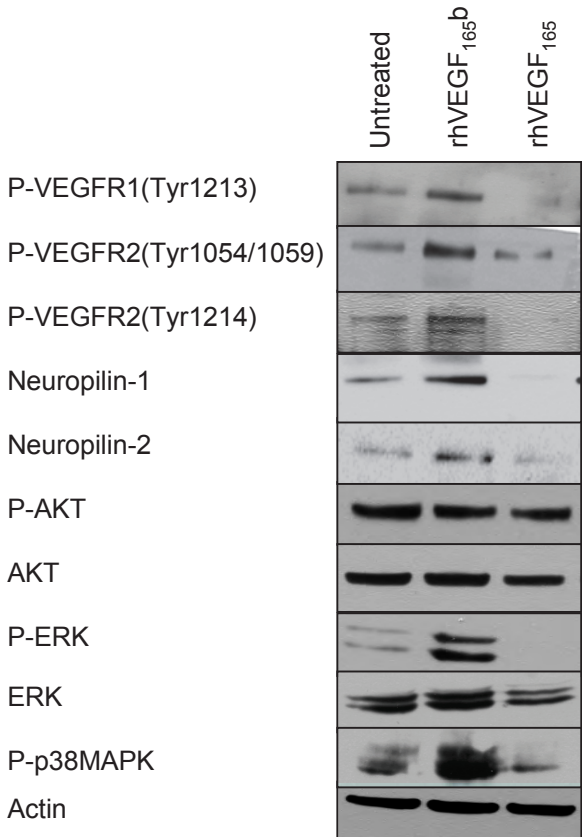
B



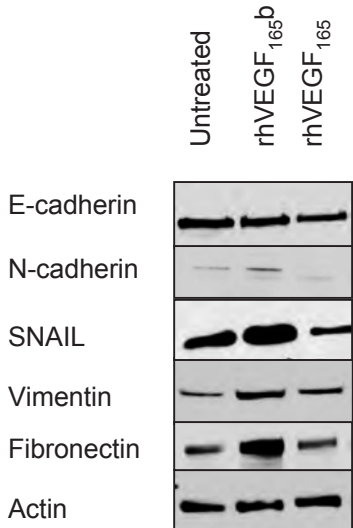
C

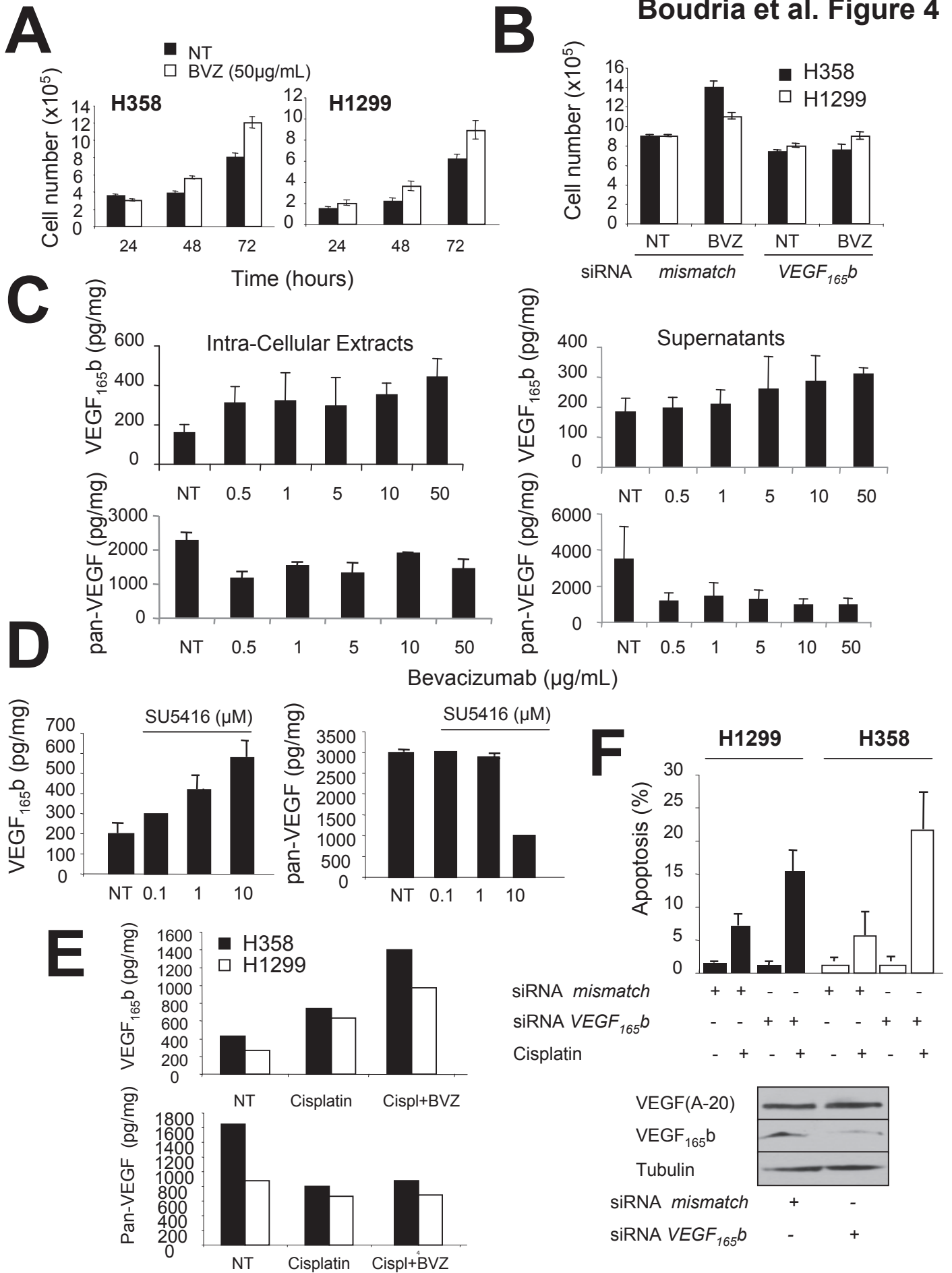


D

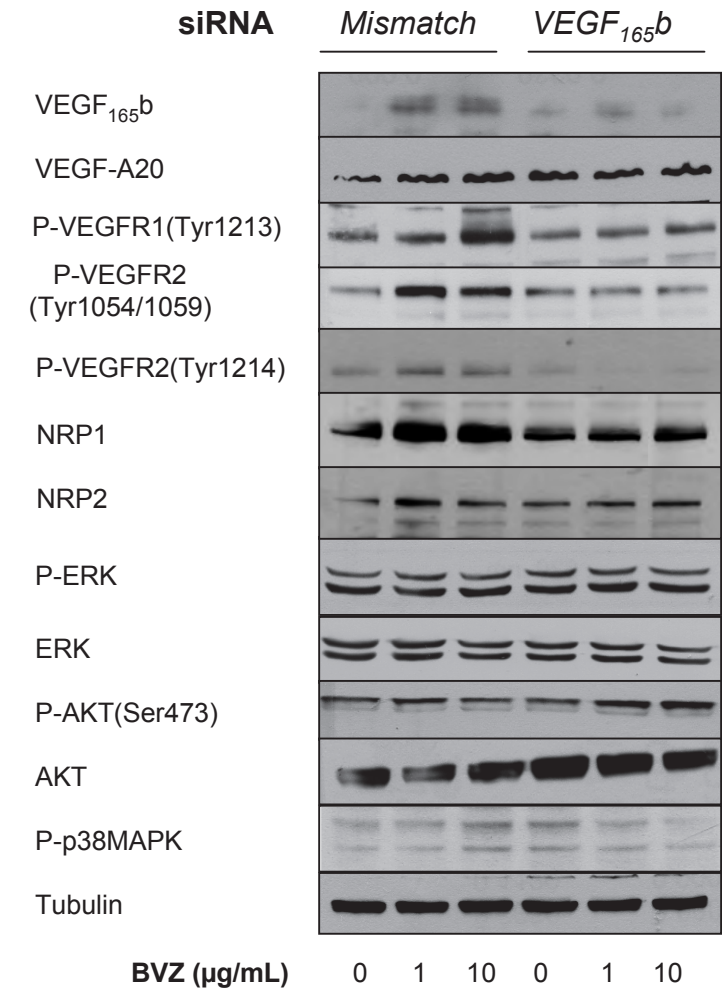


E

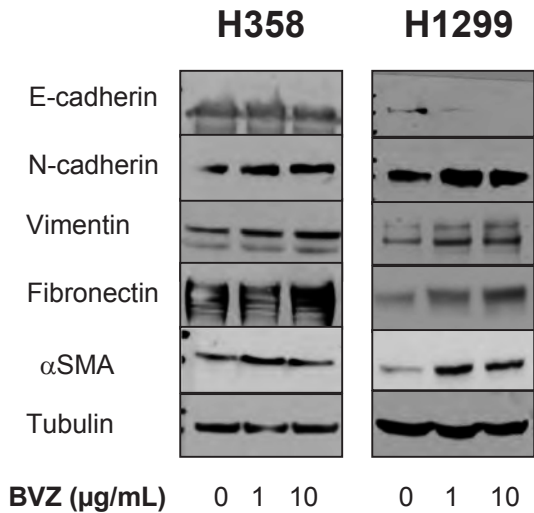




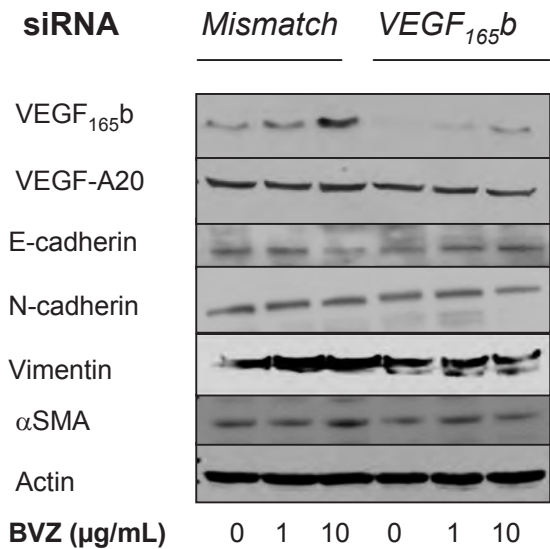
A



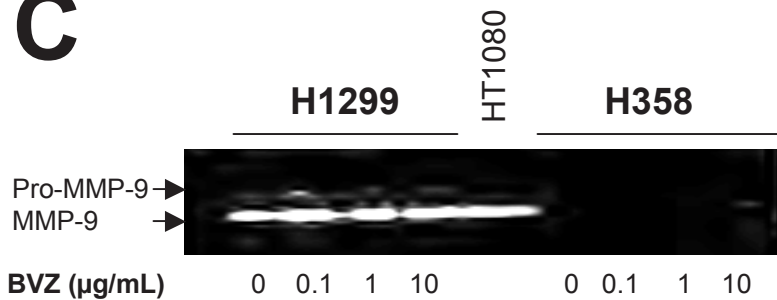
B

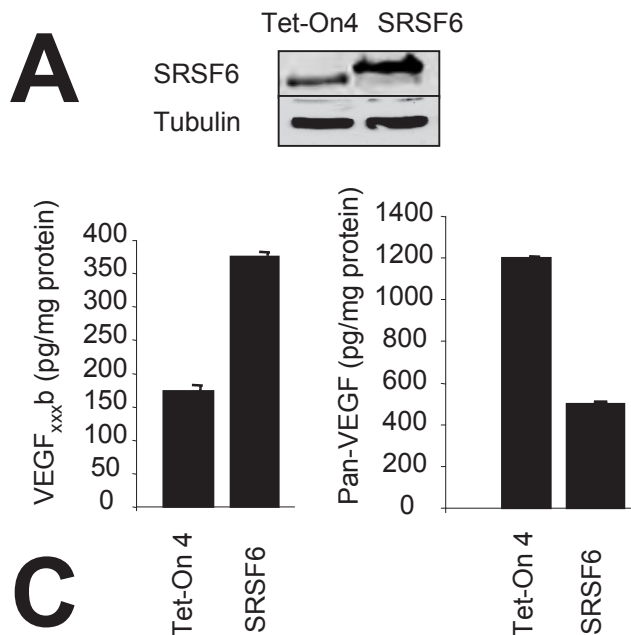


D



C





B

Boudria et al. Figure 6

Supernatant

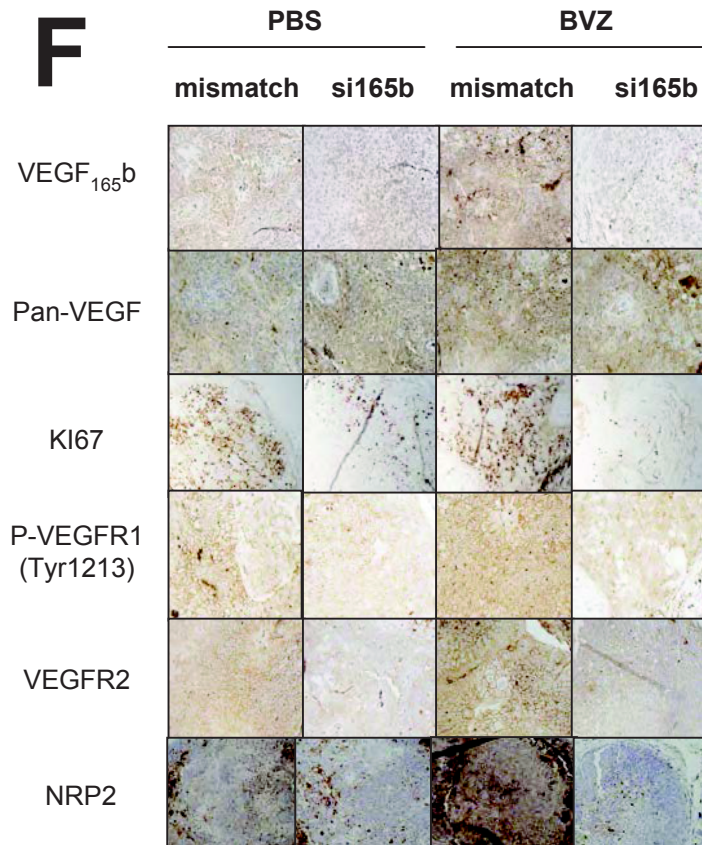
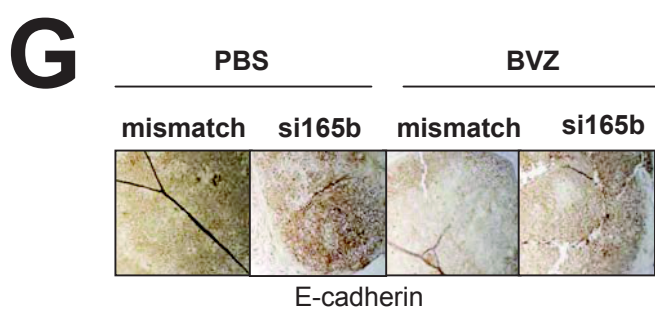
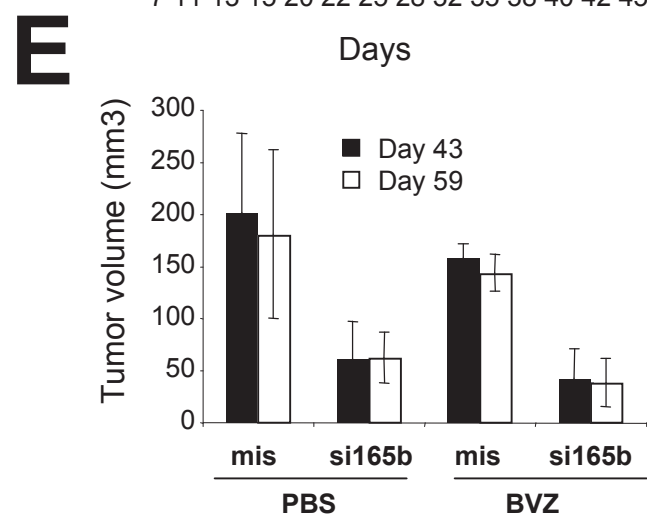
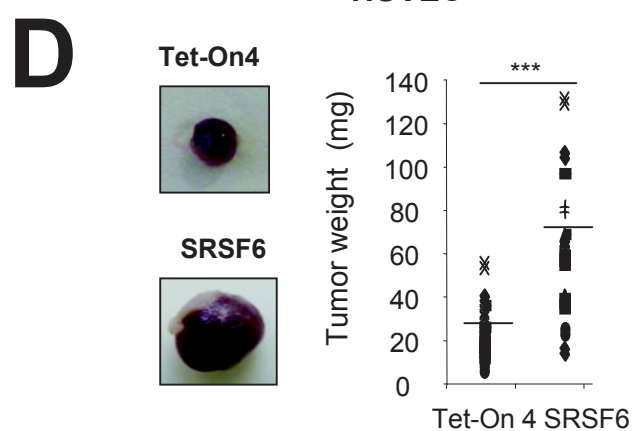
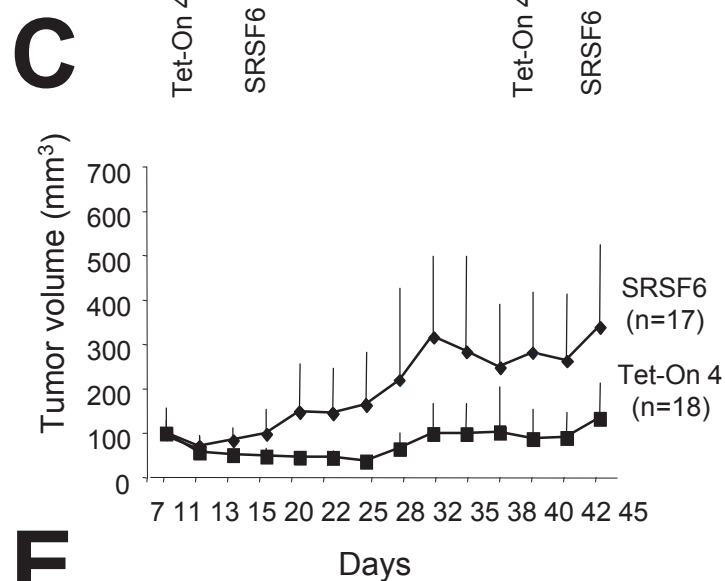
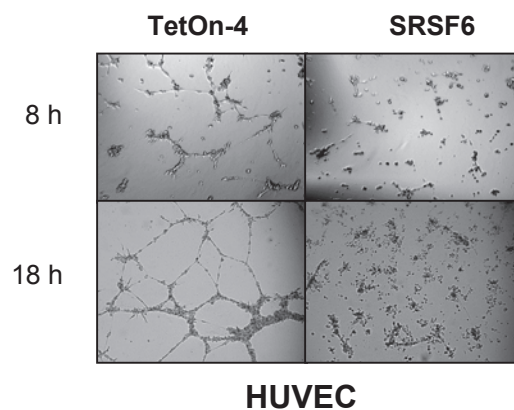


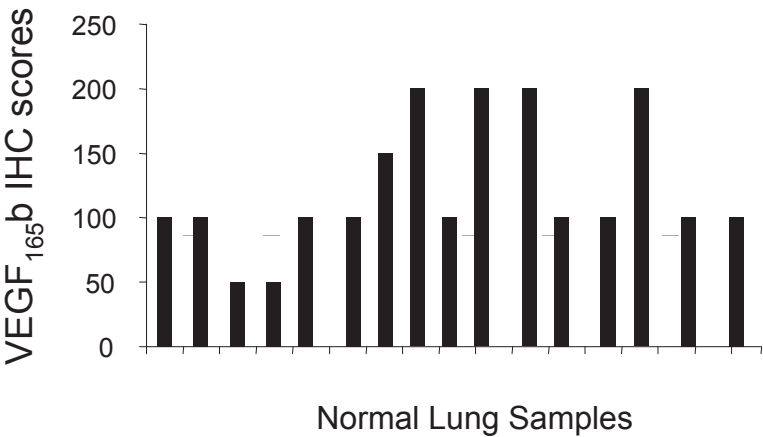
Table 1. Relationships between VEGF₁₆₅b and VEGFR1, P-VEGFR1, VEGFR2, NRP1 or NRP2 in NSCLCs.

	VEGF ₁₆₅ b expression level			P ^a
	Class 0	Class 1	Class 2	
VEGFR1				
Class 0	13 (18%)	20 (27%)	2 (3%)	0.3336
Class 1	13 (18%)	17 (24%)	9 (13%)	
P-VEGFR1(Tyr1213)				
Class 0	17 (23%)	17 (23%)	4 (5%)	0.0061
Class 1	9 (12%)	20 (28%)	7 (10%)	
VEGFR2				
Class 0	13 (18%)	12 (16%)	4 (5%)	0.2291
Class 1	13 (18%)	25 (34%)	7 (9%)	
NRP1				
Class 0	16 (24%)	13 (19%)	4 (6%)	0.1208
Class 1	7 (10%)	21 (31%)	7 (10%)	
NRP2				
Class 0	15 (22%)	11 (16%)	3 (5%)	0.0215
Class 1	8 (12%)	23 (34%)	8 (12%)	

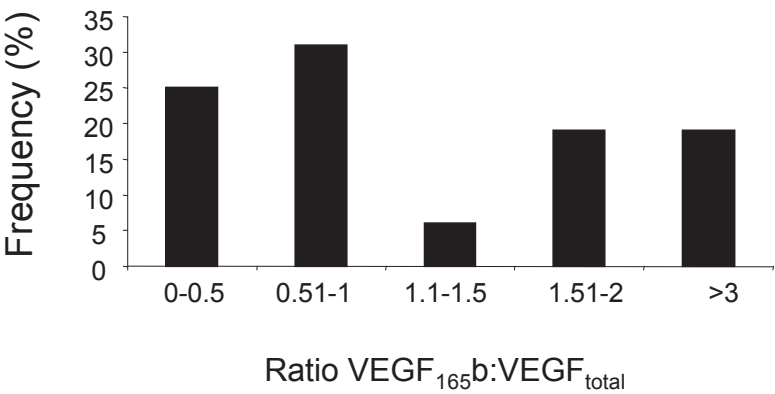
Tumors were divided in classes 0, 1 or 2 according to their expression levels in VEGF₁₆₅b, VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2, NRP1, NRP 2 as mentionned in the results section. Percentage of total tumors is indicated in the bracket.

^a Chi2 test.

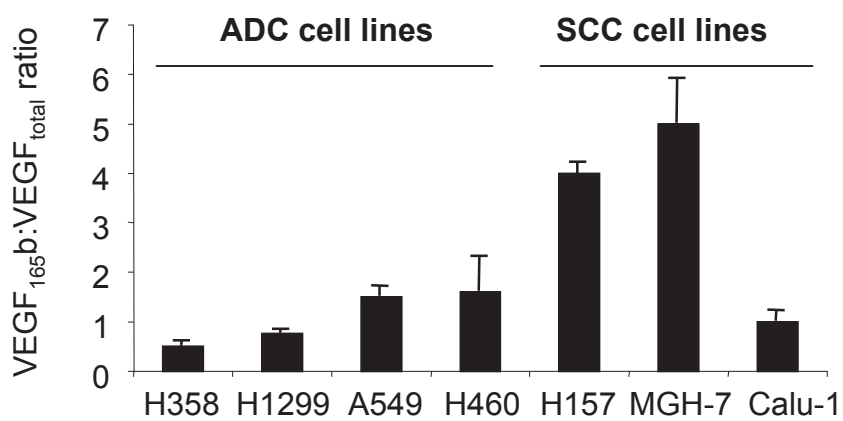
A



B

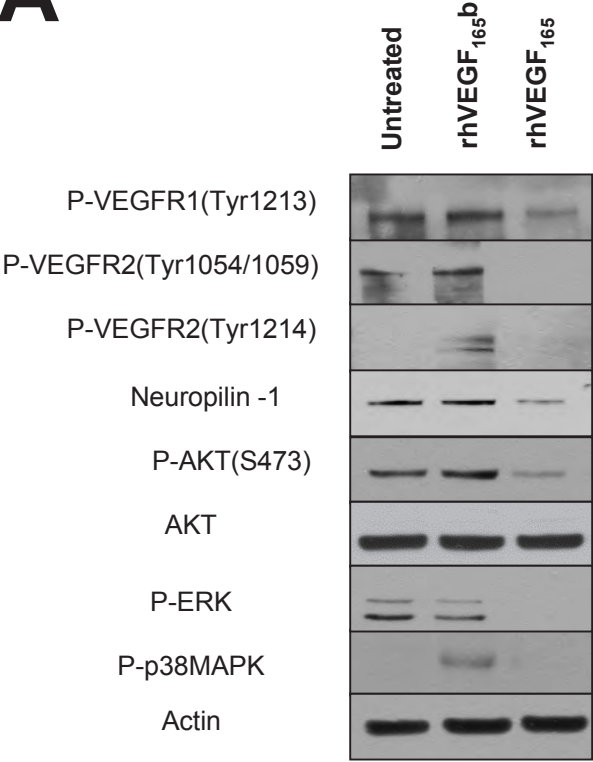


Boudria et al. Supplementary Figure 2



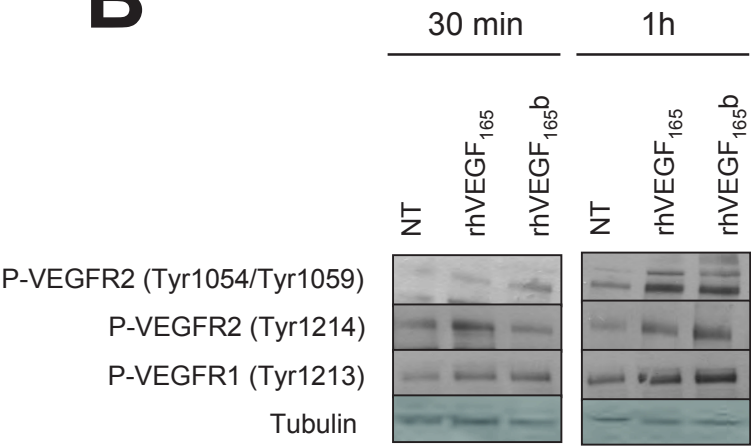
Boudria et al. Supplementary Figure 3

A



H1299

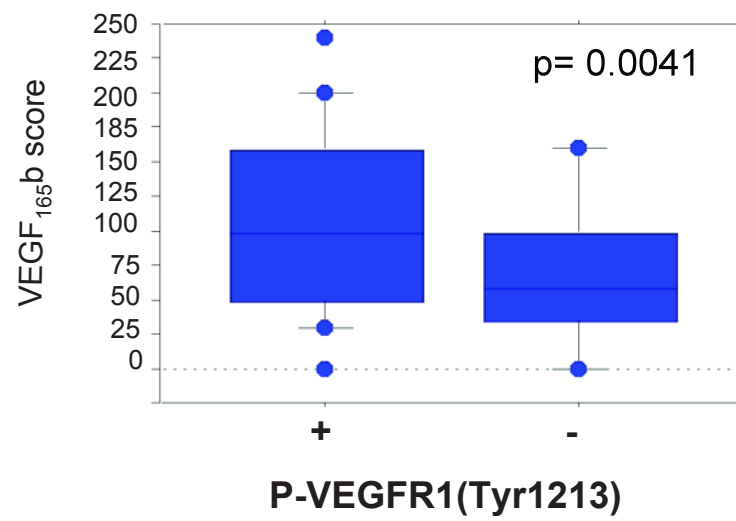
B



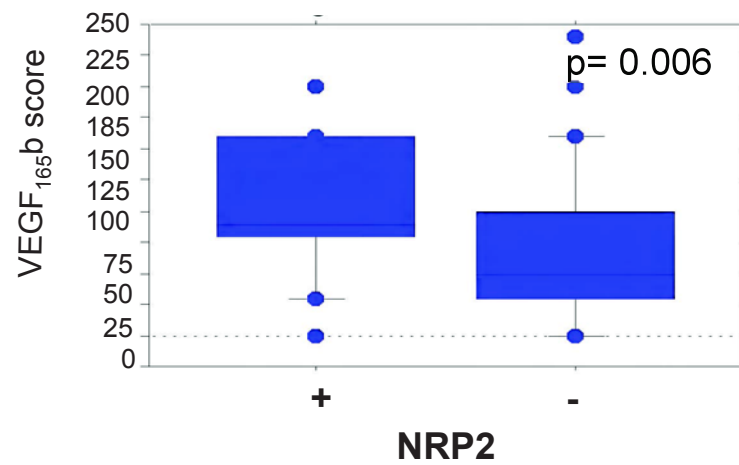
H358

Boudria et al. Supplementary Figure 4

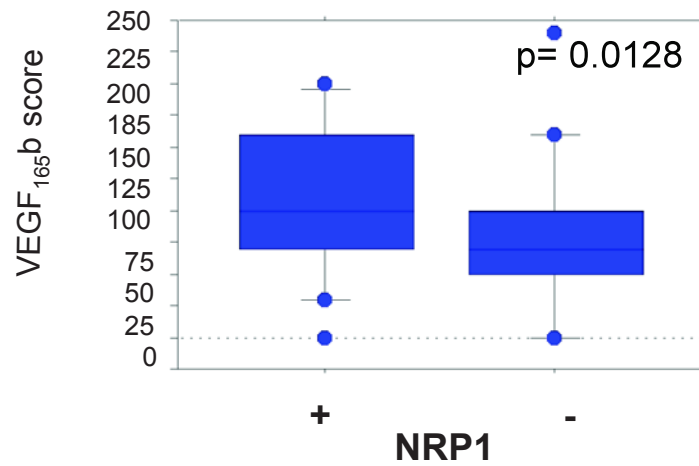
A



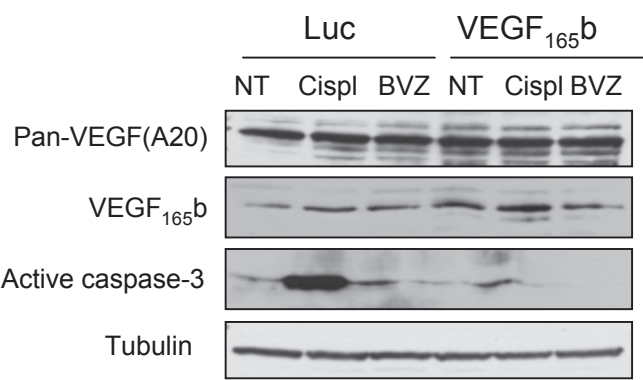
B



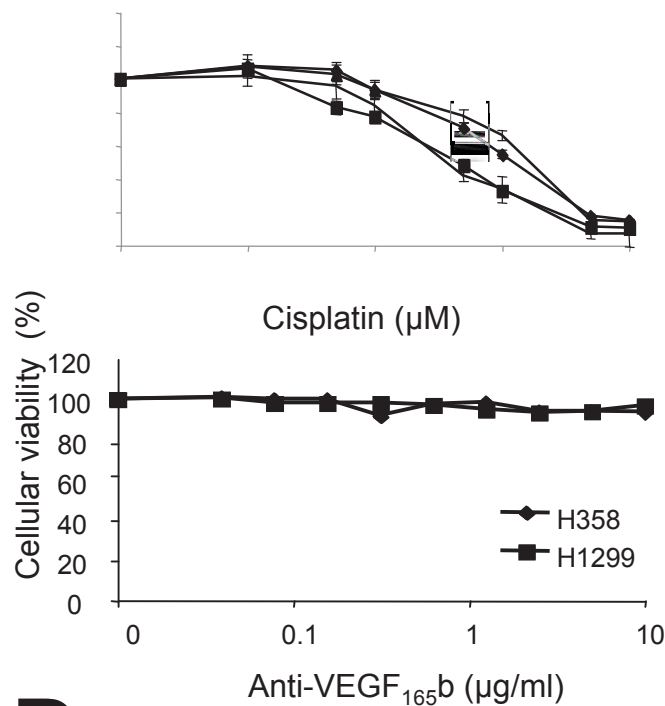
C



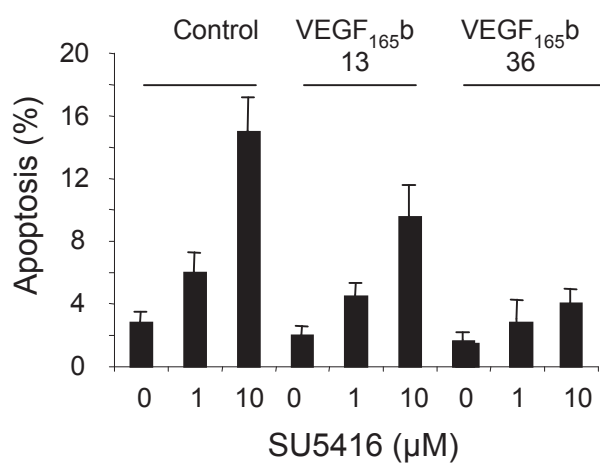
A



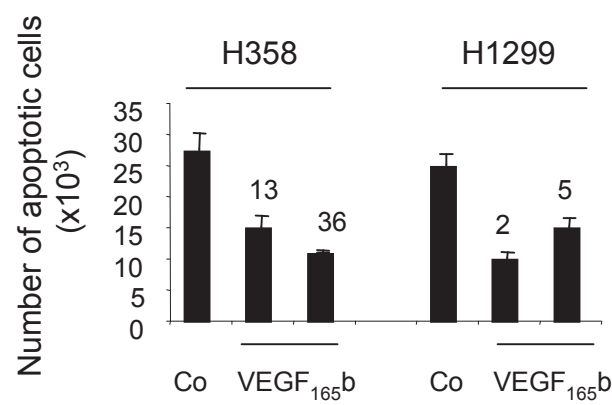
B



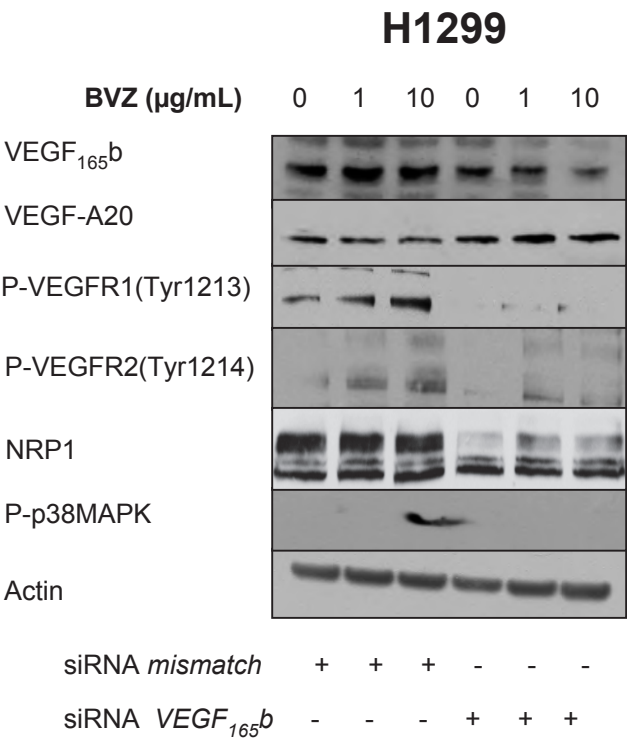
C



D



Boudria et al. Supplementary Figure 6



Supplementary Table 1. Immunohistochemical analysis of VEGF₁₆₅b and total VEGF-A (VEGF_{total}) expression in NSCLCs.

VEGF ₁₆₅ b expression level					
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	Class 2	P ^b
Adenocarcinoma	38	13 (34%)	20 (53%)	5 (13%)	NS
Squamous carcinoma	36	13 (36%)	17 (47%)	6 (17%)	
Total NSCLCs ^a	74	26 (35%)	37 (50%)	11 (15%)	
VEGF _{total} expression level					
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	Class 2	P ^b
Adenocarcinoma	38	4 (11%)	11 (29%)	23 (60%)	0.03
Squamous carcinoma	36	15 (42%)	7 (19%)	14 (39%)	
Total NSCLCs ^a	74	19 (26%)	18 (24%)	37 (50%)	

Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0 to 100%) by the level of intensity (1 to 3). According to this and as compared to the level detected in normal lung tissues, tumor samples were grouped in three classes (see materials and methods section): class 0 (low level, score 0-50), class 1 (moderate level, score 51-124), class 2 (high level considered as VEGF₁₆₅b/VEGF overexpression, score >124).
 nb=number of cases in each histological type. ^aNon Small Cell Lung Carcinoma. ^b χ^2 test. NS: non significant.

Supplementary Table 2. Relationship between VEGF₁₆₅b and VEGF_{Total} in NSCLCs.

VEGF _{Total} expression level	VEGF ₁₆₅ b expression level			P ^a
	Class 0	Class 1	Class 2	
Class 0	6 (8%)	11 (15%)	2 (3%)	NS
Class 1	7 (9%)	7 (9%)	4 (5%)	
Class 2	13 (18%)	19 (26%)	5 (7%)	

Tumors were classified in classes 0, 1, 2 according to their expression levels in VEGF_{total} and VEGF₁₆₅b as mentioned in the results section. ^a Chi-2 Test. NS: non significant.

Supplementary Table 3. Immunohistochemical analysis of VEGFR1, VEGFR2, P-VEGFR1(Tyr1213), NRP1 and NRP2 expression in NSCLC.

		VEGFR1			VEGFR2			P-VEGFR1(Tyr1213)		
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b
Adenocarcinoma	38	14 (37%)	24 (63%)	0.028	11 (29%)	27 (71%)	NS	22 (58%)	16 (42%)	NS
Squamous carcinoma	36	21 (58%)	15 (42%)		18 (50%)	18 (50%)		16 (45%)	20 (55%)	
Total NSCLCs ^a	74	35 (48%)	39 (52%)		29 (39%)	45 (61%)		38 (52%)	36 (48%)	

		Neuropilin-1			Neuropilin-2		
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b
Adenocarcinoma	34	16 (47%)	18 (53%)	NS	13 (38%)	21 (62%)	NS
Squamous carcinoma	34	17 (50%)	17 (50%)		16 (47%)	18 (53%)	
Total NSCLCs ^a	68	33 (48%)	35 (52%)		29 (43%)	39 (57%)	

Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0 to 100%) by the level of intensity (1 to 3). According to this and as compared to the level detected in normal lung tissues, tumor samples were grouped in two classes for each staining (see materials and methods section): class 0 (low level) and class 1 (high level).
 VEGFR1 (class 0, score<125; class 1, score≥125); P-VEGFR1 (class 0, score <75; class 1, score≥75).
 VEGFR2 (class 0, score<150; class 1, score≥150).
 Neuropilin-1 and neuropilin-2 (class 0, score<125, class 1 score≥125).
 nb=number of cases in each histological type. ^aNon Small Cell Lung Carcinoma. ^bχ² test. NS: not significant.
 Of note, IHC staining of NRP1/NRP2 could be performed on 34 ADC and 34 SCC only.

Supplementary Methods

Immunohistochemistry

The antibodies used for immunohistochemistry were: anti-VEGF_{165b}, a mouse monoclonal IgG1 antibody raised against the terminal nine amino acids of the VEGF_{165b} sequence (ab14994, Abcam), anti-pan VEGF-A (VEGF_{total}; VEGF-A20, sc-152, Santa Cruz), anti-phospho-VEGFR1(Tyr1213) (Millipore), anti-VEGFR1 (sc-316, Santa Cruz), anti-VEGFR2 (sc-6251, Santa Cruz), anti-neuropilin-1 (sc-5307, Santa Cruz), anti-neuropilin-2 (sc-13117, Santa Cruz), anti-KI67 (M7240, DAKO), anti-CD31 (ab28364, Abcam) and anti alpha-SMA (ab5694, Abcam). Immunohistochemical analysis was carried-out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Briefly, seven-micrometer sections were dehydrated in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in H₂O₂ solution. The antigen immunoreactivity was enhanced by microwaving the sections for 3 x 5 minutes in citrate buffer, pH 6. Then, a classical three step immunohistochemical method was applied. Incubation with the primary antibody at 4°C overnight (for manual technique) or for 1 hour at 37°C-42°C on Ventana autostainer (Ventana Medical International, Inc.) was followed by exposition to the HRP-coupled secondary antibody, and then by DAB substrate-chromogen system (K3767, DAKO). Negative control consisted in omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype.

Immunostainings were evaluated independently by two pathologists who were blinded to all clinicopathological data (EB, SL). For immunostainings evaluation, a score (0-300) was established by multiplying the percentage of tumor labelled cells (0 to 100%) by the staining intensity (0, null; 1, low; 2, moderate; 3, strong). Scores obtained for alveolar type II

pneumocytes and bronchial cells in normal lung tissues taken at distance from the tumor were considered as normal scores for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. Indeed, bronchial basal cells are considered as candidate cancer stem cells for squamous cell lung carcinoma, basaloids and small cell lung carcinoma, while type II pneumocytes-CLARA cells are considered as bronchiolo-alveolar carcinoma stem cells (BASC). According to median scores in normal tissues and to the distribution histograms, tumors were sub-divided in three classes for VEGF_{165b} and VEGF_{total} expression (class 0: low <50; class 1: moderate 51-124; class 2: high \geq 125). For VEGFR1, phospho-VEGFR1 (P-VEGFR1), VEGFR2, neuropilin-1 and neuropilin-2, tumors were sub-divided in two classes with low (class 0) or high (class 1) expression. The selected cut-offs were: class 0: score <125; class 1: score \geq 125 for VEGFR1, class 0: score <75; class 1: score \geq 75 for P-VEGFR1, class 0: score <150; class 1: score \geq 150 for VEGFR2, class 0: score <125; class 1: score \geq 125 for neuropilin-1 and neuropilin-2. The staining scores were compared in different categories using Fisher's exact test and Mann-Whitney test. All tests were two-tailed and p values < 0.05 were considered significant. The statistical analyses were done using Statview software (Abacus Concepts).

Apoptosis, wound healing, invasion and tubulogenesis assays

Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic cells on 500 cells after Hoescht 33342 staining. Cytotoxic experiments were performed using the methylene blue colorimetric assay as previously described (Salon, Merdzhanova et al. 2007; Merdzhanova, Edmond et al. 2008). To perform wound-healing assays, cells were grown on 4-wells lab-tek chamber Permanox® slides previously coated with fibronectin (10 μ g/mL) until confluence was reached. The wounding of the monolayers was done using a 200 μ L plastics tips. The wound healing process was followed using an inverted microscope equipped with a camera MicroMAX N/B (Princeton Instruments), by keeping cells in the same culture conditions than

initially described. To study cell invasion, 24-wells 8µm-pored transwells (Corning) were used. H358-VEGF₁₆₅b and H1299-VEGF₁₆₅b stable clones were grown in Petri dishes until confluence, then serum starved for 24 hours before starting the experiment. 2.5×10^5 cells in 200 µL serum free media were replated in transwells upper chambers previously coated with matrigel (cat#356231, BD Biosciences), whereas lower chambers were filled with RPMI-1640 medium supplemented with 20% FCS and 50ng/mL β-FGF as a chemoattractant. After 24 hours, non-migrating cells were removed using a cotton swab, transwell membranes were fixed using PFA 4% and colored with Hoechst. Cells were counted under a fluorescence microscope. *In vitro* tubulogenesis assay was performed as described below. Overnight serum starved HUVEC cells were plated on Matrigel coated 24-wells plates at the density of 5×10^4 cells/well. Cells were left to attach during 2 hours at 37°C. Then, medium was removed from wells, and replaced by conditioned culture supernatant derived from either stable clones over-expressing SRSF6 protein or from control cells. Tubulogenesis was followed during 24 hours using an inverted microscope equipped with a camera MicroMAX N/B (Princeton Instruments).

Article 2

Anti-angiogenic therapies regulate tumor cell adhesion and migration through VEGF₁₆₅b-mediated β 1 integrin activation and actin polymerization

Asma Boudria^{1,2}, Eva Faurobert^{2,3}, Corinne Albiges-Rizo^{2,3}, Sylvie Gazzeri^{1,2} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹ INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U823, Equipe 1, DYSAD, Grenoble, 38042, France.

Character count of the manuscript:

Running title:

Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

1. Contexte scientifique et objectifs de l'étude

La capacité du VEGF₁₆₅b à induire une signalisation autocrine soutenue et dépendante des VEGFRs dans les cellules de CBnPCs, alors qu'il est incapable de lier les neuropilines, nous a poussé à croire que ses effets pourraient être imputables à d'autres molécules. Des études récentes ont montré que les intégrines sont impliquées dans la progression tumorale. En effet, il a été montré qu'une augmentation de l'expression des intégrines était associée à l'invasion, les métastases et l'angiogenèse. Dans ce contexte, les intégrines $\beta 3$ et $\beta 5$ sont des acteurs importants pour le processus d'angiogénèse. L'intégrine $\beta 1$ a été impliquée dans la vascularisation tumorale à travers la promotion de la migration des cellules endothéliales, d'une manière dépendante ou indépendante du VEGF-A. Dans les cellules endothéliales, et de manière intéressante, il a été montré que le VEGF₁₆₅, sous sa forme liée à la matrice extracellulaire, induit une phosphorylation maintenue du VEGFR2 sur son résidu Tyr1214 ainsi qu'une activation prolongée de la phospho-p38 MAPK. Ce maintien de la signalisation VEGFR2 se produit après association de ce récepteur avec l'intégrine $\beta 1$. Ces observations faites dans les cellules endothéliales nous ont faites penser à nos observations dans les cellules de CBnPCs après traitement au VEGF₁₆₅b mais pas après traitement au VEGF₁₆₅. Le but de ce travail a donc été de déterminer le rôle que pourrait jouer l'intégrine $\beta 1$, mais aussi l'intégrine $\beta 3$, dans le maintien de la signalisation induite par le VEGF₁₆₅b dans les cellules de CBnPCs.

2. Résultats

2.1. Le VEGF₁₆₅b induit une activation de l'intégrine $\beta 1$

Nos résultats montrent une activation de l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules de CBnPCs traitées par le VEGF₁₆₅b comparativement au contrôle et aux cellules traitées par le rhVEGF₁₆₅. Nous avons aussi pu constater des taux plus élevés d'intégrine $\beta 1$ activée dans les clones surexprimant le VEGF₁₆₅b comparativement aux clones contrôle. A l'inverse, nous n'avons pas observé de variation significative de l'expression protéique de l'intégrine $\beta 3$ en réponse au VEGF₁₆₅b. Des études ont démontré dans les cancers mammaires que l'interaction entre les

protéines intégrine $\beta 1$ /neuropiline 2 joue un rôle important dans l'initiation et la progression, alors que dans les cancers pancréatiques invasifs, ce sont les complexes intégrine $\beta 1$ /neuropiline 1 qui semblent jouer un rôle dans la migration et l'invasion. Sur la base de ces résultats, nous avons ensuite recherché par des techniques de co-immunoprécipitation l'existence de complexes protéiques entre les protéines VEGFR2/intégrine $\beta 1$ ou $\beta 3$, VEGFR2/NRP1, VEGFR2/NRP2, NRP1/intégrine $\beta 1$ ou $\beta 3$ ou NRP2/intégrine $\beta 1$ ou $\beta 3$ en présence ou en l'absence de rhVEGF_{165b} ou rhVEGF₁₆₅. Malgré nos efforts et les très nombreuses expériences réalisées en présence ou en absence d'agents cross-linkants, nous n'avons pas réussi à déterminer de façon reproductible l'impact du rhVEGF_{165b} sur des complexes VEGFR2/intégrine $\beta 1$ ou $\beta 3$, VEGFR2/NRP1 et/ou VEGFR2/NRP2. A l'inverse, dans les clones surexprimant le VEGF_{165b}, nous avons montré une augmentation de l'interaction intégrine $\beta 1$ /NRP2 comparativement aux clones contrôles. Ces résultats suggèrent un rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans la signalisation médiée par le VEGF_{165b}.

2.2. Le VEGF_{165b} induit la formation de fibres de stress dans les cellules de CBnPCs

Lors de la réalisation des expériences précédentes, nous avons aussi observé que le VEGF_{165b} induit un étalement plus important des cellules de CBnPCs et une polymérisation de l'actine, ce qui génère un phénotype caractérisé par la formation de fibres de stress d'actine qu'on ne retrouve ni dans les cellules contrôles, ni dans les cellules traitées avec un autre variant d'épissage de la même taille, le VEGF₁₆₅. Ce même phénotype a aussi été observé dans les clones stables surexprimant le VEGF_{165b}. A l'inverse, au cours de ces expériences, nous n'avons pas observé la formation d'adhésions focales contenant des clusters d'intégrine $\beta 1$. L'intégrine $\beta 1$ ne serait donc pas impliquée dans la formation et ou le renouvellement des adhésions focales dans nos cellules de CBnPCs.

2.3. Le VEGF_{165b} induit une réorganisation du cytosquelette d'actine via l'activation des mêmes voies de signalisation que celles impliquées dans les cellules endothéliales

Dans les cellules endothéliales, la cascade de signalisation conduisant à la migration de ces cellules implique notamment une activation de la phosphorylation de la p38MAPK dépendante du VEGFR2 qui conduit à la phosphorylation en aval de cibles telles que les

protéines LIMK1 ou cofiline à l'origine de la polymérisation de l'actine sous la forme de fibres de stress. Parallèlement, une signalisation dépendante de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ conduit, via la phosphorylation de la FAK (*Focal Adhesion Kinase*), au turn-over des adhésions focales. Nos résultats démontrant que l'isoforme VEGF_{165b} induit une phosphorylation maintenue du VEGFR2 sur son résidu (Tyr1214) ainsi qu'une accumulation de la p38 MAPK nous ont conduits à rechercher si le VEGF_{165b} pourrait activer ces voies. Nos résultats montrent que les clones stables surexprimant l'isoforme VEGF_{165b} accumulent de la phospho-FAK et de la phospho-cofiline. Ces résultats indiquent que le VEGF_{165b} est capable d'activer les mêmes voies de signalisation que celles décrites dans les cellules endothéliales pour favoriser la migration des cellules de CBnPCs.

2.4. Le Bevacizumab génère la formation de fibres de stress d'actine dans les cellules de CBnPCs

Finalement, nos résultats démontrant un rôle du VEGF_{165b} dans l'activation de l'intégrine $\beta 1$ à l'origine de la formation de fibres de stress nous ont conduit à rechercher l'effet d'un traitement par BVZ dans ce contexte. Nous montrons que le BVZ à différentes doses et à différents temps de traitement induit l'étalement et la formation des fibres de stress d'actine dans les cellules de CBnPCs. Nos résultats montrent aussi que le traitement par BVZ induit l'accumulation de P-Src, de P-FAK et de la P-cofiline. De plus, nous montrons que le BVZ induit une augmentation significative de l'expression protéique des intégrines $\beta 1$ et/ou $\beta 3$, dont l'intensité varie selon les lignées cellulaires considérées et semble dépendre du niveau basal d'expression de ces lignées. De manière importante, l'effet du BVZ sur la formation des fibres de stress est imputable à l'augmentation des niveaux d'expression du VEGF_{165b}, puisqu'un ARN interférent ciblant le VEGF_{165b} inhibe la formation de ces fibres en réponse au BVZ. Cependant, la neutralisation du VEGF_{165b} tout comme celle de l'intégrine $\beta 3$ n'inhibe pas l'étalement des cellules en réponse au BVZ contrairement à un ARN interférent ciblant l'intégrine $\beta 1$, qui prévient à la fois la formation des fibres de stress et l'étalement. Ces résultats indiquent que les signalisations dépendantes des VEGFRs ou de l'intégrine $\beta 1$ pourraient converger. Cette possibilité semble plus probable que celle où l'intégrine $\beta 1$ formerait un complexe avec le VEGFR2.

3. Conclusion

En conclusion, notre étude montre que le VEGF_{165b} est capable d'activer l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules de CBnPC. Cette activation serait à l'origine d'un réarrangement du cytosquelette d'actine en fibres de stress. Le BVZ est capable d'induire ce même phénotype à travers l'augmentation de l'expression du VEGF_{165b} et de l'intégrine $\beta 3$. La formation de ces fibres de stress se fait suite à l'activation des mêmes voies de signalisation engagées dans les cellules endothéliales pour promouvoir ce processus, notamment les voies dépendantes de FAK et cofiline. Nos résultats mettent aussi en évidence l'existence de complexes entre la neuropiline 2 et l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules de CBnPCs. Le fait que ces complexes soient une résultante de l'activation de l'intégrine $\beta 1$ par le VEGF_{165b} ou à l'origine même de cette activation reste indéterminée. Dans les cellules endothéliales, la signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 3$ joue aussi un rôle important dans la formation de fibres de stress. Dans les cellules de CBnPCs, nous montrons qu'elle semble importante pour l'activation des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 en l'absence d'intégrine $\beta 1$ notamment. Nos résultats fournissent les premières données démontrant que le VEGF_{165b} est capable de signaler à travers les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les cellules de CBnPCs. De plus l'implication récente de l'intégrine $\beta 1$ dans la résistance des glioblastomes au BVZ, suggère fortement que le ciblage thérapeutique de l'intégrine $\beta 1$ puisse potentialiser les effets du BVZ dans les tumeurs en prévenant l'apparition d'un phénotype invasif.

Anti-angiogenic therapies regulate tumor cells spreading and actin polymerization through VEGF₁₆₅-regulated $\beta 1/\beta 3$ integrins

Asma Boudria^{1,2}, Eva Faurobert^{2,3}, Corinne Albiges-Rizo^{2,3}, Sylvie Gazzeri^{1,2} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹ INSERM, U823, Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Grenoble, 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U823, Equipe 1, DYSAD, Grenoble, 38042, France.

Character count of the manuscript:

Running title:

Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U823 Equipe 2

Institut Albert Bonniot, BP170

38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

Introduction

VEGF-A pre-mRNA alternative splicing plays a key role in the control of tumor neoangiogenesis through the generation of two sub-families with either pro-(VEGF_{xxx}) or anti-(VEGF_{xxx}b) angiogenic functions (1, 2). Although some controversial debate still exists regarding the existence and/or the anti-angiogenic functions of the VEGF_{xxx}b isoforms (3-5), we and others previously demonstrated the existence of such isoforms in various cellular models as well as in various tumor types and further showed their role in preventing neo-angiogenesis (6-11). In addition, Bates and colleagues recently showed that metastatic colorectal patients with a low VEGF₁₆₅b:VEGF_{total} ratio exhibit a better outcome when treated with FOLFOX4 + bevacizumab compared with FOLFOX4 alone, highlighting VEGF₁₆₅b as a potential predictive biomarker for Bevacizumab treatment (12). One of the author's explanations was that tumors with low VEGF₁₆₅b expression level could be the most angiogenic ones and thereby the most sensitive to Bevacizumab. On the other hand, one might postulate that VEGF_{xxx}b isoforms also act on tumor cells themselves through autocrine signaling pathway, a function that could contribute to the global tumor response to anti-angiogenic drugs. Until now, this aspect remains largely unexplored. We previously showed that Non Small Cell Lung Carcinomas (NSCLCs) express VEGFR receptors, VEGFR1 and VEGFR2, and their co-receptors neuropilin-1 and neuropilin-2 (13). We recently provided evidence that the VEGF₁₆₅b splice variant activates an autocrine VEGFR1/VEGFR2-dependent signaling pathway that contributes to the generation of cells with more aggressive features (Boudria et al., submitted). These *in vitro* data were validated *in situ* in NSCLC patients, as we found a direct correlation between high levels of VEGF₁₆₅b and P-VEGFR1(Tyr1213) proteins and lymph node metastases. Importantly, we further showed that anti-angiogenic therapies such as Bevacizumab increase the expression of VEGF₁₆₅b leading

to the activation of such autocrine loop. Altogether, these data highly suggested that a VEGF₁₆₅b/VEGFR-activated signaling pathway may be involved in both NSCLCs progression and escape from anti-angiogenic therapies (Boudria et al., submitted). The aim of the present study was to further deepen the molecular mechanisms by which VEGF₁₆₅b activates VEGFR receptors.

Integrins are cell-adhesion molecules that mechanosense the microenvironment and elicit extracellular-matrix(ECM)-induced signaling in both normal and pathological states such as cancer. Upregulation of integrins has been associated with invasion, metastasis and angiogenesis (14). β 3 and β 5 integrins have been implicated in angiogenesis and several approaches are under investigation in the clinic (15). β 1 integrin has important functions during tumor vascularization such as VEGF-dependent (16) and VEGF-independent angiogenesis by promoting endothelial cell migration (17). Interestingly, in endothelial cells, Chen and colleagues previously showed that matrix-bound VEGF₁₆₅ is able to maintain activation of VEGFR2 on its tyrosine 1214 residue leading to the activation of phospho-p38 MAPK. Such effects were found to occur through association of VEGFR2 with β 1 integrin (18). When performing the above mentioned study in NSCLC cells, we reproducibly found that recombinant VEGF₁₆₅b triggers a sustained activation of P-VEGFR2 on its tyrosine 1214 residue as well as activation of p38-MAPK (Boudria et al., submitted). Therefore, we postulated that VEGF₁₆₅b impacts on β 1 integrin to activate VEGFR receptors in tumor cells. In this study, we found that VEGF₁₆₅b up-regulates and activates β 1 integrin leading to tumor cells spreading and formation of actin stress fibers. In addition, we demonstrated that VEGF₁₆₅b stimulates the interaction between activated β 1 integrin and neuropilin-2 in NSCLC cells. Moreover, we found that β 3 integrin is also involved in the formation of actin

stress fibers but not cell spreading in rhVEGF₁₆₅b-treated NSCLC cells and is required for VEGFR1/VEGFR2 activation in these cells. Finally, we provided the first evidence that Bevacizumab treatment triggers cell spreading and actin stress fibers formation by a mechanism involving VEGF₁₆₅b, β 1 integrin and neuropilin-2 proteins. Overall, these data reveal an interplay between VEGF₁₆₅b, VEGFR1/VEGFR2, β 1/ β 3 integrins and neuropilin-2 that could control tumor cells migration in response to anti-angiogenic therapies.

Materials and Methods

Cell culture and Reagents

Human lung adenocarcinoma cell lines (H358, H1299) were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine and 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) as previously described (11). Bevacizumab (Avastin®) was provided by Roche/Genetech, Indianapolis, IN, USA. Protein recombinant VEGF₁₆₅b was from R&D systems Duoset VEGF₁₆₅b ELISA kit (cat#DY3045), protein recombinant VEGF₁₆₅ was from R&D systems Quantikine human VEGF immunoassay (Cat# DVE00). Protein recombinant VEGF₁₂₁ (4644-vs) and recombinant VEGF₁₈₉ (CRV114A, Cell Sciences) were also purchased from R&D systems.

Generation of VEGF₁₆₅b-overexpressing stable H358 and H1299 clones

H358 Rvluc and H1299 Rvluc clones were transfected either with a pcDNA3 empty vector or with a pcDNA3-VEGF₁₆₅b encoding vector using Fugene® 6 reagent (Roche Diagnostic, France) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were grown in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and 800 µg/ml geneticin (G418) for at least 4 weeks in order to select stable transfected clones. Single colonies were isolated and expanded for further analyses. Cell culture conditions were maintained as initially described. Two representative VEGF₁₆₅b-overexpressing clones were chosen for H358 (clones 13 and 36) and H1299 (clones 2 and 5) cells. Both clones gave similar results in each cell line. To perform wound-healing assays, cells were grown on 4-wells lab-tek chamber Permanox® slides previously coated with fibronectin (10µg/mL) until confluence was reached. The wounding of the monolayers was done using a 200µL plastics tips. The wound healing process was followed using an inverted microscope equipped with a camera MicroMAX N/B (Princeton Instruments), by keeping cells in the same culture conditions than initially described.

Impedance experiments

H1299 cells were serum-starved during 30 min at 37°C and incubated or not with rhVEGF₁₆₅ 0.1 ng/ml or rhVEGF₁₆₅b 0.1 ng/ml recombinant ligands combined or not with ATN 10µM. Cells were seeded in a 16-wells plate previously coated with 2µg/ml fibronectin and impedance was followed in regular culture conditions using Xelligence system (Ozyme Technology). In some experiments, cells were tranfected for 72 hours with various siRNA as described earlier before plating.

Analysis of activated β 1 integrin by flow cytometry

Cells were trypsinized, washed with PBS 1X and resuspended in 200 μ l of PBS/BSA 1%. Cells were then centrifugated, resuspended in PBS/BSA 1% additioned or not with Mn^{2+} 0.5 mM and incubated on ice during 15 min. Primary antibody 9EG7 was added and incubated during 30 min. Finally, cells were washed twice with PBS 1X, incubated with a secondary Alexa⁴⁸⁸ anti-rat antibody and fixed with 4% PFA. Cells were then washed and resuspended in PBS 1X before flow cytometry analysis.

Antibodies

The antibodies used were: anti-VEGF₁₆₅b (MAB3045, R&D systems), anti-VEGF-A (A20, sc-152) and anti-neuropilin-2 (clone C-9, sc-13117) from Santa Cruz, anti-tubulin from TEBU, anti-phospho-VEGFR2-Tyr1054/1059 (ab5473) and anti-neuropilin-1 (ab81321) from Abcam, anti- β 1 integrin activated clone 9EG7 (553715) from BD Pharmingen, anti-VEGFR2 (mAB2479, clone 55B11), anti-phospho-cofilin (3311) and anti LIMK1/2 (3841) from Cell Signaling, anti-phospho-VEGFR2-Tyr1214 (44-1052) and anti-phospho-Src (44660G) from Invitrogen, anti-phospho-VEGFR1-Tyr1213 (cat#07-758) from Millipore, and anti-phospho-FAK (2211S) from Epitomics. Serum 227 anti- β 1 integrin total used in western-blot analysis and serum TS2/16 anti- β 1 integrin activated used in immunoprecipitation assays were home made antibodies provided by the team of Corinne Albiges-Rizo.

RNA interference

Small interfering RNA (siRNA) and control non-targeting siRNA (*mismatch*) were purchased from EUROGENTEC (Liège Science Park, BELGIUM). β 1 integrin silencing was performed using SMARTpool siGENOME ITGB1 siRNA (M-004506-00-0020) and β 3 integrin silencing was performed using SMARTpool siGENOME ITGB3 siRNA (M-004124-02-0020) from Thermoscientific. Transfection using smartpools was performed using Oligofectamine RNAi max (13778150, Invitrogen). The sequences for *NRPI* siRNA were designed as sense, 5'-GAGAGGUCCUGAAUGUCC-3'; antisense, 5'-GGAACAUUCAGGACCUCUC-3'. The sequences for *NRP2* siRNA were designed as sense, 5'-AAAGGCUGGAAGUCAGCACUAAUUU-3'; antisense, 5'-AAAAAUUAGUGCUGACUUCCAGCUU-3'. The siRNA targeting *VEGF_{165b}* was designed as sense, 5'-GAACGUACUUGCAGAUUCUCUC-3'; antisense, 5'-GAGAGAUCUGCAAGUACGUUCtt-3'. Transfection was performed using OligofectamineTM reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Cellular fractionation and western-blotting analysis

Immunoblotting analyses were performed as previously described (11). Briefly, cells monolayers were washed 3 times with PBS 1X and cell lysis was performed directly on petri dishes by adding RIPA buffer and incubating petri dishes on ice for 30 min. Cells were scraped, cellular protein extracts were recovered and lysates were centrifugated at 13000 rpm for 30 min at 4°C. Equal amounts of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and probed with indicated antibodies.

Immunoprecipitation experiments

Cells were lysed on ice using RIPA buffer supplemented just before use with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors and 5 μ M sodium molybdate to enhance the cross-linking of the complexes. One mg of total protein extracts were pre-cleared by 1 hour incubation in the presence of a mixture of protein A- and protein G-coated magnetic beads. Then, they were incubated overnight at 4°C, together with protein A/protein G beads, either with TS2/16 serum, or an anti- β 1 integrin antibody (sc-6622) or an anti-VEGFR2 antibody (mAb2479) to immunoprecipitate activated β 1 integrin, total β 1 integrin or total VEGFR2, respectively. An irrelevant rabbit IgG (GTX26797, GeneTex) was used as control of immunoprecipitation. Immunoprecipitates were recovered by centrifugation, washed three times in NET 1X buffer in order to discard unspecific binding and subjected to western blotting using the indicated antibodies. In parallel, 20 μ g of total cellular lysates were applied to adjacent lanes (input).

Immunofluorescence studies

Round 12mm glass coverslips were placed in 24-wells plates and coated overnight at 4°C with 2 μ g/mL fibronectin. After that, cells were trypsinized, serum starved during 30 min, then seeded on the washed glass coverslips coated with fibronectin during 24h. Following this period, various treatments were performed. Immunofluorescence studies of β 1 integrin were performed on fixed, but non permeabilized, cells using the 9EG7 antibody that recognizes the activated β 1 integrin. A secondary antibody coupled with Alexa 488 (A11006, Invitrogen)

was used to visualize activated $\beta 1$ integrin. Actin stress fibers were visualized on fixed and permeabilized cells after staining with phalloidin TRITC (P-1951, Sigma Aldrich).

Results

VEGF₁₆₅b-overexpressing cells activate $\beta 1$ integrin

$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins have been involved in the activation of VEGFR receptors in endothelial cells (19-21). In order to assess their potential role in NSCLC cells in response to VEGF₁₆₅b, we first used stable H358 or H1299 derived clones overexpressing VEGF₁₆₅b to analyze the protein level of $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin by western blotting. Of note, H1299 cells were found to express higher basal level of $\beta 1$ integrin compared to H358 cells. We showed an increased level of $\beta 1$ but not of $\beta 3$ integrin in VEGF₁₆₅b-overexpressing H358 cells compared to control cells (Figure 1A). In H1299 cells, VEGF₁₆₅b overexpression led to a faint increase of $\beta 3$ integrin protein level, while that of $\beta 1$ integrin remained unchanged. However, in these cells, we were able to detect the activation of $\beta 1$ integrin by immunoprecipitation using a serum targeting the activated $\beta 1$ integrin (Figure 1B). Such activation of $\beta 1$ integrin was confirmed by immunofluorescence studies using an anti-activated $\beta 1$ integrin antibody in H1299 cells exposed for 30 minutes to rhVEGF₁₆₅b (Figure 1C). Interestingly, in these cells, rhVEGF₁₆₅ treatment did not lead to $\beta 1$ integrin activation (Figure 1C). In addition, an increased activation of $\beta 1$ integrin was also observed by cytometry in cells treated with rhVEGF₁₆₅b, compared to unstimulated or rhVEGF₁₆₅-stimulated cells (Figure 1D). Overall, these results demonstrated that VEGF₁₆₅b induces accumulation of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, as well as activation of $\beta 1$ integrin in NSCLC cells. Of note, we were not able to analyze the activation

of $\beta 3$ integrin or to immunoprecipitate $\beta 3$ integrin in our cells, as there is no efficient antibody available.

VEGF₁₆₅b stimulates cell spreading and actin stress fibers formation by a mechanism involving $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins

When performing the above immunofluorescence studies, we reproducibly observed that cells overexpressing VEGF₁₆₅b display distinct morphological features when plated onto fibronectin-coated coverslips, compared to control cells. Hence, they appeared more spreaded out (Figure 2A). These morphological features correlated with the accumulation of phospho-FAK and phospho-cofilin proteins, which activation has been shown to be required for endothelial cell migration in response to VEGFR2 activation (Figure 2B) (19). Interestingly, when cells overexpressing VEGF₁₆₅b (Figure 2A) or treated with rhVEGF₁₆₅b (Figure 2C) were immunostained for filamentous F-actin by phalloidin-TRITC, we detected the formation of actin stress fibers. By contrast, F-actin staining was rather cortical and never organized in stress fibers in control or rhVEGF₁₆₅-treated cells (Figure 2C). The differential effects of rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b on cell spreading were also confirmed by impedance measurements. In these experiments, rhVEGF₁₆₅b-treated cells spreaded out more rapidly onto fibronectin, than control or rhVEGF₁₆₅-treated cells. Importantly, such effects of rhVEGF₁₆₅b were significantly reversed when cells were co-incubated with a pharmacological inhibitor of $\beta 1$ integrin (Figure 2D), suggesting the involvement of $\beta 1$ integrin in these functions. Overall, these data demonstrate that rhVEGF₁₆₅b is able to trigger F-actin polymerization in NSCLC cell lines by a mechanism that could involve $\beta 1$ integrin.

Bevacizumab stimulates cell spreading and actin stress fibers formation by a mechanism involving $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins as well as VEGF_{165b}

As we previously demonstrated that Bevacizumab increases VEGF_{165b} protein level (Boudria et al., submitted), we then tested whether it could also control F-actin polymerization in NSCLC cells. Interestingly, we observed that treating H1299 cells for 72 hours or 7 days with increasing amounts of Bevacizumab (1 to 10 $\mu\text{g/ml}$) leads to the appearance of more spreaded cells exhibiting actin stress fibers, as compared to untreated cells (Figure 3A). In addition, Bevacizumab treatment was found to increase $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin protein level in H358 or H1299 cells, respectively (Figure 3B), thereby suggesting that both integrins might play a role in the effects of Bevacizumab. Consistently, the specific knock-down of VEGF_{165b} (Figure 3C) or $\beta 3$ integrin (Figure 3D) in Bevacizumab-treated cells was found to reverse the formation of actin stress fibers but not the cell spreading. In contrast, the knock-down of $\beta 1$ integrin in Bevacizumab-treated cells prevented both cell spreading and actin stress fibers formation (Figure 3D), suggesting that $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins could act on distinct signalling pathways. Overall, these data provide evidence that Bevacizumab promotes cell spreading and actin stress fibers formation in NSCLCs by a mechanism involving both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, as well as the VEGF_{165b} splice variant.

$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins differentially control VEGFR1/VEGFR2 activation

In order to deepen the cellular signalling pathways activated downstream of $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin in our cells, we first analyzed the consequences of their specific knock-down on VEGFR1 and VEGFR2 activation. In the absence of VEGF₁₆₅ or VEGF_{165b} stimulation, we reproducibly

found that the knock-down of $\beta 1$ integrin strongly enhances the activation of both VEGFR1 and VEGFR2 receptors, as demonstrated by their accumulation under phosphorylated form onto Tyr1213 and Tyr1214 residues, respectively (Figure 4A). By contrast, the knock-down of $\beta 3$ integrin decreased the activation on both receptors (Figure 4A). In addition, as shown in immunofluorescence studies (Figure 3D) and impedance measurements (Figure 4B), the knock-down of $\beta 1$ integrin was found to enhance while that of $\beta 3$ integrin to decrease cell spreading on fibronectin. Again, these results demonstrated that $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins may activate distinct signalling pathways in NSCLC cells to control cellular spreading.

Activation of VEGFR is not sufficient to trigger actin stress fibers formation in Bevacizumab-treated cells in the absence of $\beta 1$ integrin

The above data prompted us to investigate the effects of the knock-down of $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin on the cellular signaling pathways activated in response to Bevacizumab. In our cells, we previously showed that Bevacizumab activates VEGFR1/VEGFR2 receptors through a VEGF₁₆₅b-dependent autocrine loop (Boudria et al., submitted). In this study, we found that Bevacizumab also leads to the accumulation of phospho-SRC (P-SRC), phospho-FAK (P-FAK) and P-cofilin in H1299 cells (Figure 5). Although not significantly modulated by Bevacizumab, we also detected the phosphorylated form of the LIMK1 kinase in our cells. Surprisingly, when $\beta 1$ integrin was knocked-down in bevacizumab-treated cells, we observed a stronger activation of VEGFR1(Tyr1213) that was associated with a significant decrease in P-FAK, P-SRC and P-cofilin protein levels compared to *mismatch*-transfected treated cells (Figure 5). On the other hand, when $\beta 3$ integrin was knocked-down in treated cells, we observed a significant decrease of VEGFR1 activation, that was also correlated with a decrease of P-FAK, P-SRC, P-LIMK1 and P-cofilin proteins (Figure 5). Similar results were

also obtained in bevacizumab-treated H358 cells regarding VEGFR1 and VEGFR2 activation/inactivation upon knock-down of β 1 or β 3 integrin, respectively (data not shown). Therefore, these data suggested that β 3 integrin may be predominantly involved in the control of VEGFR1/VEGFR2 activation in response to Bevacizumab treatment in NSCLC cells. In addition, and combined with immunofluorescence studies (Figure 3), these western blotting results indicated that activation of VEGFR receptors upon Bevacizumab treatment is not sufficient to induce the phosphorylation of the downstream targets FAK, SRC and cofilin as well as to trigger actin stress fibers formation in the absence of β 1 integrin.

NRP2 interacts with β 1 integrin and is required for actin stress fibers formation in response to Bevacizumab treatment

Despite a lot of assays, we were unable to clearly and reproducibly detect complexes between VEGFR2/ β 1 integrin or VEGFR2/ β 3 integrin in response to rhVEGF₁₆₅b stimulation or overexpression. Of note, we also looked for potential interaction between P-VEGFR1(Tyr1213)/ β 1 integrin or P-VEGFR1(Tyr1213)/ β 3 integrin. Recent studies have highlighted direct interactions between integrins and neuropilins, notably neuropilin-2, during cancer progression (22, 23). In our cells, we had previously observed that VEGF₁₆₅b increases the expression level of neuropilins (Boudria et al., submitted). In addition, *in situ*, we had also found a significant correlation between high levels of VEGF₁₆₅b and NRP2 in a series of NSCLC patients. These data led us to analyze the role of neuropilins in the formation of actin stress fibers induced by VEGF₁₆₅b or Bevacizumab treatment. To this purpose, we used siRNA specifically targeting either NRP1 or NRP2. As shown in Figure 6A, we first found that neutralization of NRP1 significantly increases NRP2 expression, whereas knock-down of NRP2 significantly increases NRP1 expression. Using immunofluorescence studies, we

further showed that the knock-down of NRP2 significantly decreases the number, the length and the thickness of actin stress fibers in Bevacizumab-treated cells, compared to untreated cells, while the knock-down of NRP1 has less effect (Figure 6B). Importantly, combining both NRP1 and NRP2 siRNAs also significantly prevented actin stress fibers formation in Bevacizumab-treated cells (Figure 6B). Similar results regarding the impact of the NRP1 or NRP2 knock-down on actin stress fibers were obtained upon rhVEGF_{165b} stimulation (Figure 6C). Taken together, these data indicated that NRP2 rather than NRP1, is required for actin stress fibers formation in response to VEGF_{165b} and Bevacizumab. Finally, and perhaps more importantly, using co-immunoprecipitation experiments, we detected an increased interaction between activated β 1 integrin and NRP2 protein in cells overexpressing VEGF_{165b} compared to control cells (Figure 6D). Overall, these data highly suggest the existence of a signalling network involving VEGF_{165b}, β 1 integrin and NRP2 proteins that allows the formation of actin stress fibers in response to Bevacizumab treatment in NSCLC tumor cells.

Discussion

Endothelial cells migration is essential for angiogenesis and requires the activation of several signalling pathways in response to VEGF-A, that ultimately converge on cytoskeletal remodeling through phosphorylation of numerous targets including the LIMK1, cofilin or Hsp27 protein (19). Actin remodeling is at the heart of the endothelial cell migration and actin stress fiber-mediated contraction of the cell body allows forward progression. It has been previously shown that the full-length VEGF_{165b} isoform inhibits endothelial cells proliferation and migration in a dose dependent-manner (6). Conversely, in this study, we provided evidence that VEGF_{165b} stimulates NSCLC tumor cells spreading and actin stress fibers

formation by a mechanism involving the $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins as well as the VEGF co-receptor neuropilin-2. Such morphological features were associated with activation of downstream targets of $\beta 1/\beta 3$ signalling pathways, such as SRC, FAK or cofilin. In addition, we evidenced an interaction between $\beta 1$ integrin and neuropilin-2 in VEGF_{165b}-overexpressing cells, highlighting a closed interplay between both proteins in response to VEGF_{165b}. Furthermore, we demonstrated that bevacizumab treatment also promotes cell spreading and actin stress fibers formation through a mechanism requiring VEGF_{165b}, $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins as well as neuropilin-2 expression. Interestingly, it was very recently demonstrated that $\beta 1$ integrin and its downstream effector kinase FAK are up-regulated in bevacizumab-resistant glioblastoma compared with pretreatment paired specimens, and that accumulation of $\beta 1$ integrin contributes to bevacizumab resistance in these patients (24). Therefore, our data extend to NSCLC the potential role of $\beta 1$ integrin as a marker of response to Bevacizumab treatment. In addition, as we also found a role of $\beta 3$ integrin in this setting, our data highly suggest that both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins should be considered as potential markers of tumor response to anti-angiogenic therapies.

In a previous study, we have demonstrated that VEGF_{165b}-exposed and Bevacizumab-treated NSCLC cells acquire some markers of epithelial to mesenchymal transition such as fibronectin or vimentin, as well as secrete active matrix metalloproteases (Boudria et al., submitted). Such features have been well-shown to promote cell invasion (25). In addition, we have found *in situ* in NSCLC patients a direct correlation between high levels of VEGF_{165b} and lymph node metastases, thereby suggesting that VEGF_{165b} could contribute to tumor cells migration. Complementing the switch in gene expression, cells undergoing EMT also alter their morphology and reorganize their actin cytoskeleton. In this setting, the switch of actin

from cortical architecture to stress fibers associated with focal adhesion complexes enhances the ability of the cell to migrate (26). Therefore, combined with our previous data, the observation that VEGF₁₆₅b and Bevacizumab trigger cell spreading and actin stress fibers formation strongly argue that such process could select tumor cells with enhanced ability to migrate. In addition, we provide here evidence that both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins could be involved in such a process in NSCLC cell lines, since their specific knock-down strongly decreases the ability of Bevacizumab to induce actin stress fibers formation. In this setting, it is interesting to notice that the knock-down of either $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin in VEGF₁₆₅b-overexpressing cells significantly reduced their ability to migrate in a wound-healing assay (our unpublished data).

We found that neutralization of $\beta 1$ integrin in the absence of VEGF ligand enhances VEGFR1 and VEGFR2 activation, whereas neutralization of $\beta 3$ integrin decreases such activation. Activation of VEGFR1/VEGFR2 upon $\beta 1$ integrin knock-down was found to enhance cell spreading as quantified by impedance measurements, while the inverse occurs in $\beta 3$ integrin-deprived cells. These data suggested that VEGFR-activated downstream signalings are involved in cell spreading. Moreover, when Bevacizumab treatment was applied, enhanced or decreased activation of VEGFR1 in H1299 cells but also VEGFR2 in H358 cells was again observed in treated cells knocked-down for $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin respectively, compared to *mismatch* treated cells. These results indicated that $\beta 1$ integrin is not required for VEGFR1/VEGFR2 activation upon Bevacizumab treatment, whereas $\beta 3$ integrin is. However, when we considered the downstream signalling targets, we found that accumulation of P-FAK, P-SRC or P-cofilin was prevented in both $\beta 1$ or $\beta 3$ integrin deprived-cells, thereby indicating that both integrins cooperate for activation of these targets. In addition, as cell

spreading was only prevented upon $\beta 1$ integrin neutralization in Bevacizumab-treated cells, these results also indicated that inactivation of VEGFR-activated signalling pathways in $\beta 3$ deprived cells is not sufficient to prevent cell spreading. One plausible explanation could be that the interaction between $\beta 1$ integrin and NRP2 we detected upon VEGF_{165b} expression might play a role. However, this is not consistent with the observation that neuropilin-2 knock-down does not prevent cell spreading in Bevacizumab-treated cells. Taken together, our data are in favor of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins activating distinct but cooperative VEGFR-dependent signalling pathways to control cell spreading and actin polymerisation. Interestingly, it has been shown in endothelial cells that enhanced VEGFR2-mediated signaling in $\beta 3$ -null endothelial cells was neuropilin-1 dependent through the elevated interactions between VEGFR2 and neuropilin-1 (21). In striking contrast, neuropilin-1 contributed less substantially to these processes when $\beta 3$ integrin was expressed (21). Therefore, $\beta 1$ integrin could compete with VEGFR receptors for binding to neuropilins in NSCLC cells. In the absence of $\beta 1$ integrin, enhanced activation of VEGFR could be related to the recruitment of neuropilins inside complexes between VEGFR1, VEGFR2 or $\beta 3$ integrin. Unfortunately, and although we performed numerous experiments to investigate such possibility, we were not able to reproducibly and efficiently co-immunoprecipitate protein complexes between VEGFR1, VEGFR2, $\beta 1/\beta 3$ integrin or neuropilin-1/2 proteins in our cells upon rhVEGF_{165b} stimulation.

Autocrine VEGF-A signalling has been shown to synergize with EGFR to promote the development of squamous carcinoma through NRP1-dependent activation of VEGFR1 (27). In addition, VEGF-A/VEGFR2/NRP1 autocrine signalling was required for maintenance and self-renewal of a cancer stem cell pool (28). These data highlighted neuropilins are critical

regulators of VEGF-A autocrine functions. In this study, we found that VEGF_{165b} significantly increases the interaction between neuropilin-2 and activated β 1 integrin. In breast cancer cells, NRP2 was previously shown to interact with and to activate α 6 β 1 integrin to promote activation of FAK-dependent signaling pathways and tumor invasion (22, 23, 29). In addition, it was also shown that NRP2^{high} population of tumor cells harvested from invasive breast carcinomas expressed higher levels of α 6 β 1 integrin and active FAK (29). As we also evidenced a significant correlation between high levels of VEGF_{165b} and NRP2 *in situ* in NSCLCs (Boudria et al., submitted), it remains to be determined whether NRP2 could also control β 1 integrin expression and/or activation in NSCLC patients. In addition, it remains to determine whether the interaction between NRP2 and β 1 integrin is able to trigger FAK activation in our cells. Importantly, clinical trials involving patients with advanced gastric and breast cancers assessed the efficacy of Bevacizumab and concluded that high intra-tumoral NRP1 expression is prognostic of a poor response to Bevacizumab (30-31). Therefore, our data suggest that intra-tumoral expression of NRP2 could also be related with the response to Bevacizumab in NSCLC patients.

To conclude, it was recently shown in human lung adenocarcinoma patients that upregulation of β 1 integrin significantly correlates with advanced clinical stages, lymph node metastases, increased relapse rate and decreased overall survival (32). As we previously showed that high levels of VEGF_{165b} also correlate with lymph node metastases, and as we demonstrated here that Bevacizumab and VEGF_{165b} trigger β 1 integrin activation to promote actin stress fibers formation in NSCLC cells, we therefore propose a model in which the activation by VEGF_{165b} of an autocrine loop involving VEGFR1/VEGFR2, β 1/ β 3 integrins and neuropilin-2 protein leads to the acquisition of a more invasive phenotype that contributes to the resistance of NSCLCs to anti-angiogenic therapies.

References

1. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):575-85.
2. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett*. 2007 May 8;249(2):133-42.
3. Bates DO, Mavrou A, Qiu Y, Carter JG, Hamdollah-Zadeh M, Barratt S, et al. Detection of VEGF-A_{xxx}b Isoforms in Human Tissues. *PLoS One*.8(7):e68399.
4. Harris S, Craze M, Newton J, Fisher M, Shima DT, Tozer GM, et al. Do anti-angiogenic VEGF (VEGF_{xxx}b) isoforms exist? A cautionary tale. *PLoS One*.7(5):e35231.
5. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, et al. VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer*.9:320.
6. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF₁₆₅b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Jul 15;62(14):4123-31.
7. Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, Hulse RP, Dersch R, Lehrling C, et al. VEGF-A₁₆₅b Is an Endogenous Neuroprotective Splice Isoform of Vascular Endothelial Growth Factor A in Vivo and in Vitro. *Am J Pathol*. Sep;183(3):918-29.
8. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF(_{xxx})b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2007 Jul 16;97(2):223-30.

9. Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ, Wheatley ER, Stewart L, Mather S, et al. VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1183-93.
10. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. Jul 22;109(3):e14-26.
11. Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, Brambilla C, et al. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene*. Sep 30;29(39):5392-403.
12. Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE, Varey AH, Ramani P, O'Dwyer PJ, et al. Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res*. Nov 15;18(22):6384-91.
13. Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*. 2003 Jul;200(3):336-47.
14. Foubert P, Varner JA. Integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Methods Mol Biol*. 757:471-86.
15. Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep*. 2006 Mar;8(2):96-103.

16. Leenders WP, Kusters B, Verrijp K, Maass C, Wesseling P, Heerschap A, et al. Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6222-30.
17. Azam F, Mehta S, Harris AL. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur J Cancer.* May;46(8):1323-32.
18. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.* Feb 22;188(4):595-609.
19. Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007 Mar 30;100(6):782-94.
20. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell.* 2000 Oct;6(4):851-60.
21. Robinson SD, Reynolds LE, Kostourou V, Reynolds AR, da Silva RG, Tavora B, et al. Alpha β 3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem.* 2009 Dec 4;284(49):33966-81.
22. Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, et al. GLI1 regulates a novel neuropilin-2/ α 6 β 1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol Med.* Apr;5(4):488-508.
23. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* Nov 22;13(12):871-82.
24. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. β 1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* May 15;73(10):3145-54.

25. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1429-37.
26. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):15-33.
27. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell.* Jan 22;140(2):268-79.
28. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature.* Oct 20;478(7369):399-403.
29. Goel HL, Pursell B, Standley C, Fogarty K, Mercurio AM. Neuropilin-2 regulates alpha6beta1 integrin in the formation of focal adhesions and signaling. *J Cell Sci.* Jan 15;125(Pt 2):497-506.
30. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol.* Dec;11(12):1172-83.
31. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol.* Mar 20;31(9):1219-30.
32. Zhang PF, Zeng GQ, Yi LZ, Liu JP, Wan XX, Qu JQ, et al. Identification of integrin beta1 as a prognostic biomarker for human lung adenocarcinoma using 2D-LC-MS/MS combined with iTRAQ technology. *Oncol Rep.* Jul;30(1):341-9.

Legends to the Figures

Figure 1. VEGF₁₆₅b activates β 1 integrin. (A) H358 and H1299 clones overexpressing VEGF₁₆₅b (VEGF₁₆₅b) or not (Control) were analyzed for expression of β 1 and β 3 integrins by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) Total protein extracts from H1299 clones overexpressing or not VEGF₁₆₅b were immunoprecipitated using the TS2/16 serum that is specific of the activated form of β 1 integrin, then the amount of activated β 1 integrin was assessed by western-blotting analysis. An irrelevant IgG was used as a negative control. (C) H1299 cells were treated or not (control) during 30 min either with 0.1 ng/ml VEGF₁₆₅ or 0.1 ng/ml VEGF₁₆₅b as indicated, then they underwent immunofluorescent specific probing for activated β 1 integrin. Similar results were obtained when 1 ng/ml rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b was used. (D) Quantification of activated β 1 integrin in untreated, rhVEGF₁₆₅- or rhVEGF₁₆₅b-treated H1299 cells was performed by flow cytometry as described in the material and methods section.

Figure 2. VEGF₁₆₅b induces actin stress fibers formation. (A) H1299 clones overexpressing VEGF₁₆₅b and controls were cultured during 24 hours on a fibronectin matrix, then F-actin was probed using Phalloidin-TRITC. (B) H358 or H1299 clones overexpressing VEGF₁₆₅b (VEGF₁₆₅b) or not (Control) were analyzed by immunoblotting for the expression of the indicated proteins. Tubulin was used as a loading control. (C) H1299 cells were coated on fibronectin for 24 hours, then treated during 30 min either with VEGF₁₆₅ 0.1 ng/ml or VEGF₁₆₅b 0.1 ng/ml before F-actin detection by immunofluorescence using phalloidin-TRITC. (D) Impedance measurements were performed as described in the materials and

methods section in H1299 cells either untreated or treated during the indicated times with VEGF₁₆₅ 0.1 ng/ml or VEGF_{165b} 0.1 ng/ml in the presence or absence of ATN 10 μ M.

Figure 3. Bevacizumab triggers actin stress fibers formation by a molecular mechanism involving VEGF_{165b} and β 1/ β 3 integrins. (A, C, D) H1299 cells were treated or not for 72 hours or 7 days by Bevacizumab 1 μ g/ml or 10 μ g/ml as indicated. Untreated or treated cells were concomitantly transfected with either *mismatch*, VEGF_{165b}, β 1 integrin or β 3 integrin siRNA as indicated. Visualization of actin polymerization was performed by immunofluorescence on permeabilized and fixed cells using phalloidin-TRITC. (B) Western blot analysis of β 1 or β 3 integrin was performed in H1299 or H358 cells treated with the indicated amounts of Bevacizumab for 72 hours. Tubulin was used as a loading control.

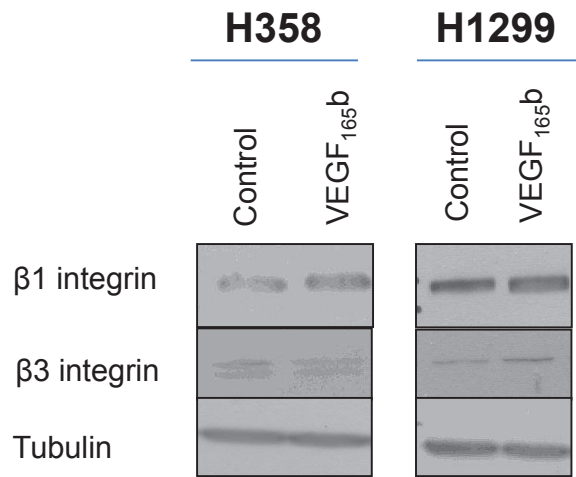
Figure 4. Neutralization of either β 1 or β 3 integrin does not regulate VEGFR in the same way in absence of ligand. (A) H1299 cells were transfected every 24 hours and during 72 hours with *mismatch* siRNA or siRNA specifically designed to knock-down β 1 integrin or β 3 integrin. Activation of VEGFR1 and VEGFR2 was assessed by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) Impedance measurements were performed in H1299 cells coated on fibronectin matrix that had been previously transfected for 72 hours with either *mismatch* or β 1 or β 3 integrin siRNA.

Figure 5. β 1 and β 3 integrins-dependent signalling pathways are activated in response to Bevacizumab treatment. H1299 cells were treated (BVZ) or not (NT) for 72 hours with Bevacizumab 10 μ g/ml. At the same time, they were transfected either with *mismatch*, β 1 or

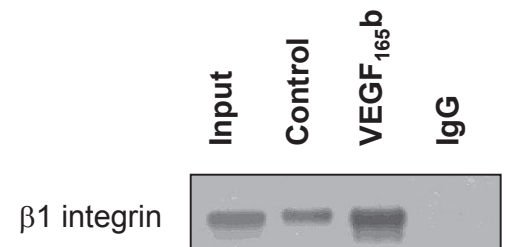
$\beta 3$ integrin siRNA. Western-blotting analysis was performed on total cellular extracts using the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control.

Figure 6. Neuropilin-2 (NRP2) interacts with $\beta 1$ integrin and is involved in actin stress fibers formation upon VEGF_{165b} expression or Bevacizumab treatment. (A) H1299 cells were transfected for 72 hours with either *mismatch*, *neuropilin-1* (NRP1), *neuropilin-2* (NRP2) or both *NRP1* and *NRP2* (NRP1+NRP2) siRNA. Analysis of the indicated proteins was performed by western blotting. Hsp70 was used as a loading control. (B) H1299 cells were transfected with either *mismatch*, *neuropilin-1* (NRP1), *neuropilin-2* (NRP2) or both *NRP1* and *NRP2* (NRP1+NRP2) siRNA and treated (BVZ) or not (untreated) for 72 hours with Bevacizumab 10 μ g/ml. Immunofluorescence visualization of F-actin was performed in the same conditions. (C) H1299 cells were transfected for 72 hours with either *mismatch*, *neuropilin-1* (NRP1), *neuropilin-2* (NRP2) or both *NRP1* and *NRP2* (NRP1+NRP2) siRNA. Then, they were treated (VEGF_{165b}) or not (untreated) for 30 minutes with rhVEGF_{165b} 0.1 ng/ml. Immunofluorescence visualization of F-actin was performed in the same conditions. (D) Total cellular protein extracts obtained from H1299 clones overexpressing VEGF_{165b} (VEGF_{165b}) or not (Control) were immunoprecipitated using the TS2/16 serum that is specific of the activated form of $\beta 1$ integrin. Then, the amount of activated $\beta 1$ integrin or neuropilin-2 present in each sample was assessed by immunoblotting using an anti- $\beta 1$ integrin or anti-neuropilin-2 antibody. An irrelevant IgG was used as a negative control.

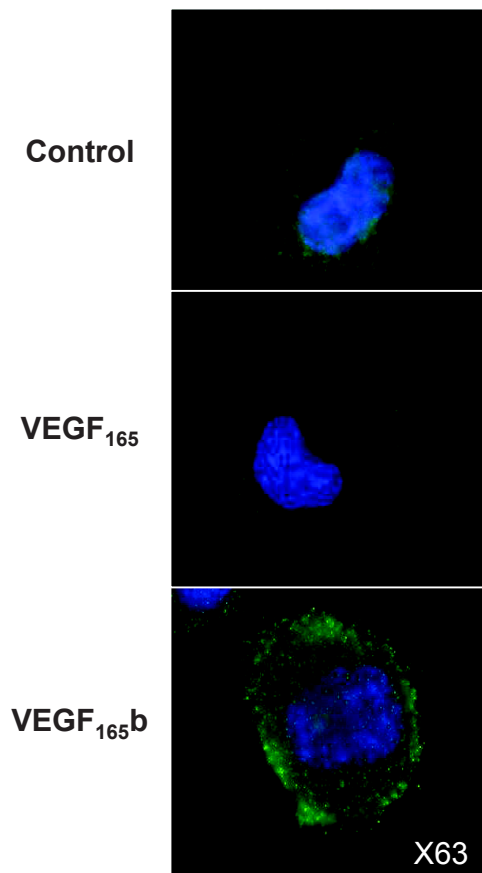
A



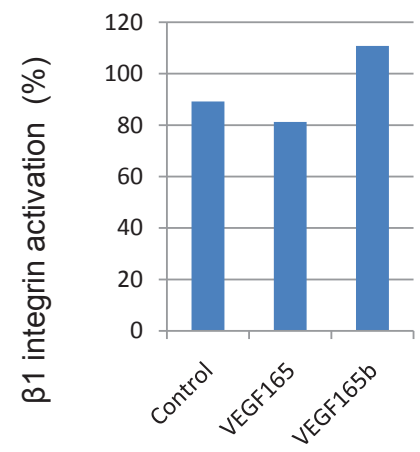
B



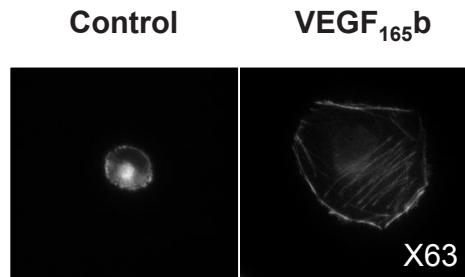
C



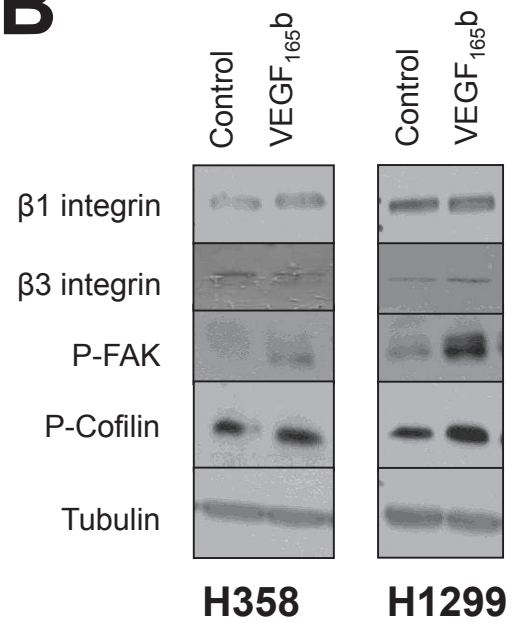
D



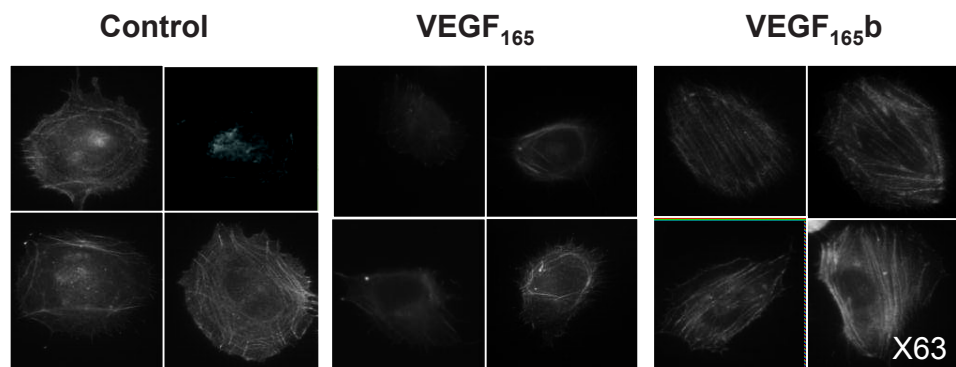
A



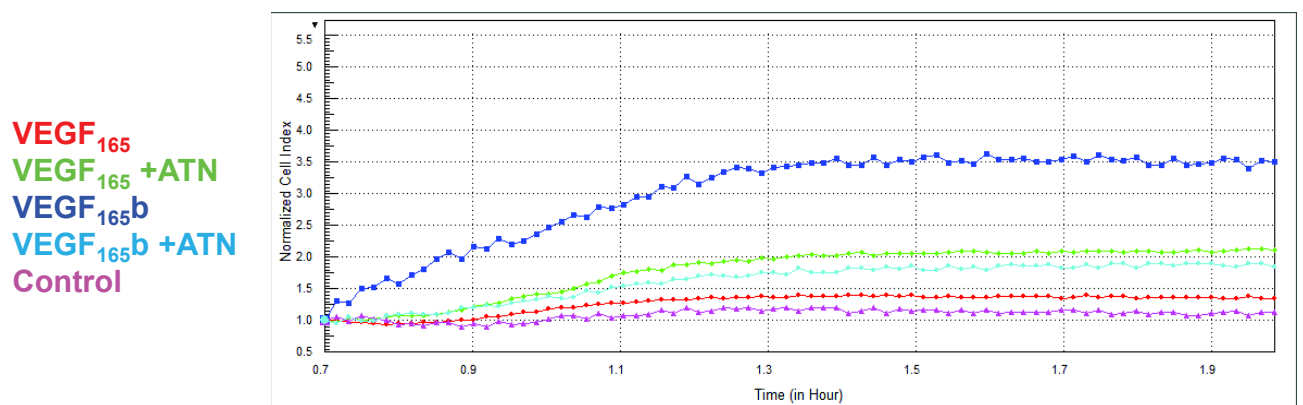
B



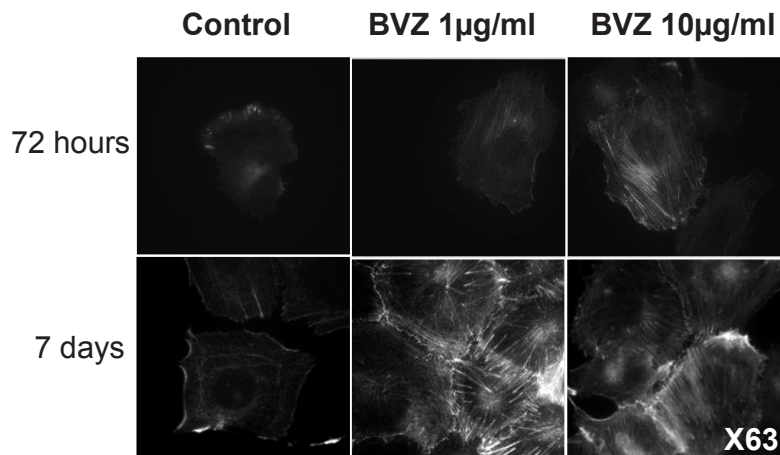
C



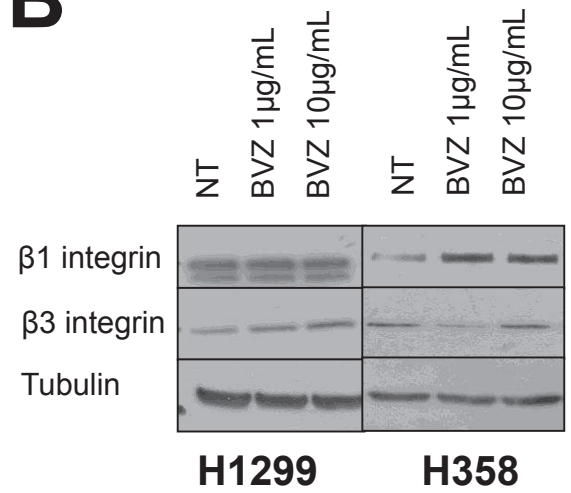
D



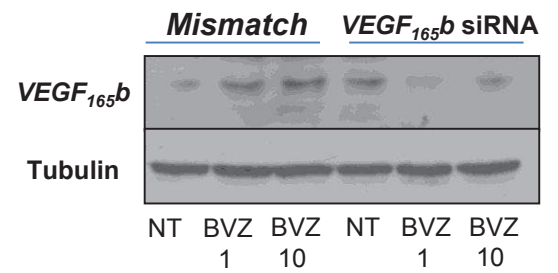
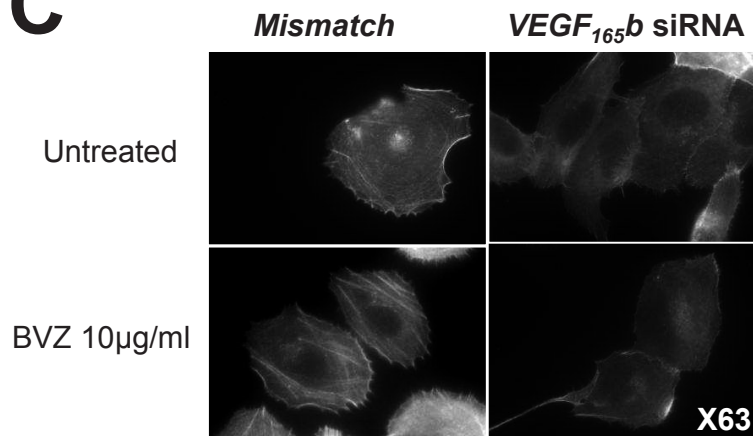
A



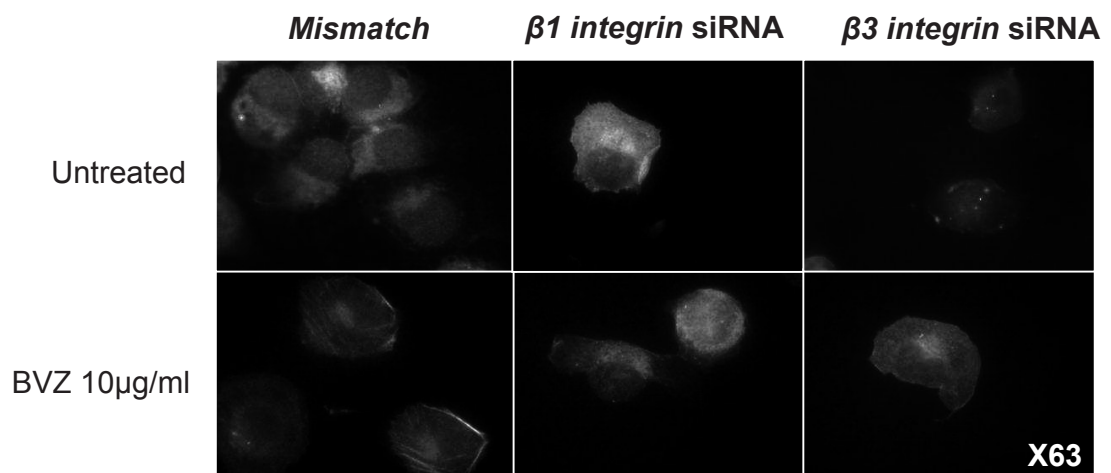
B



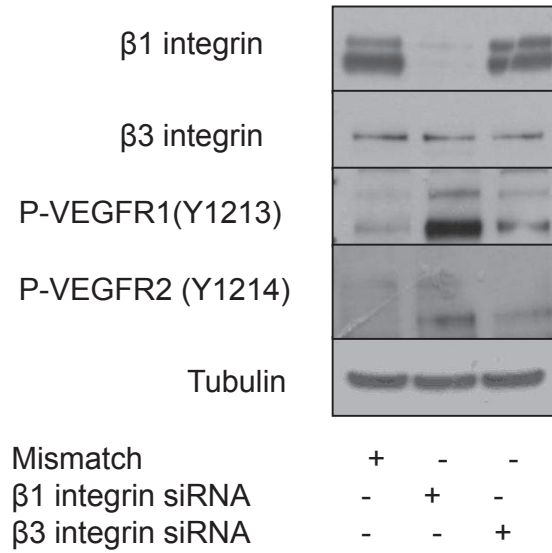
C



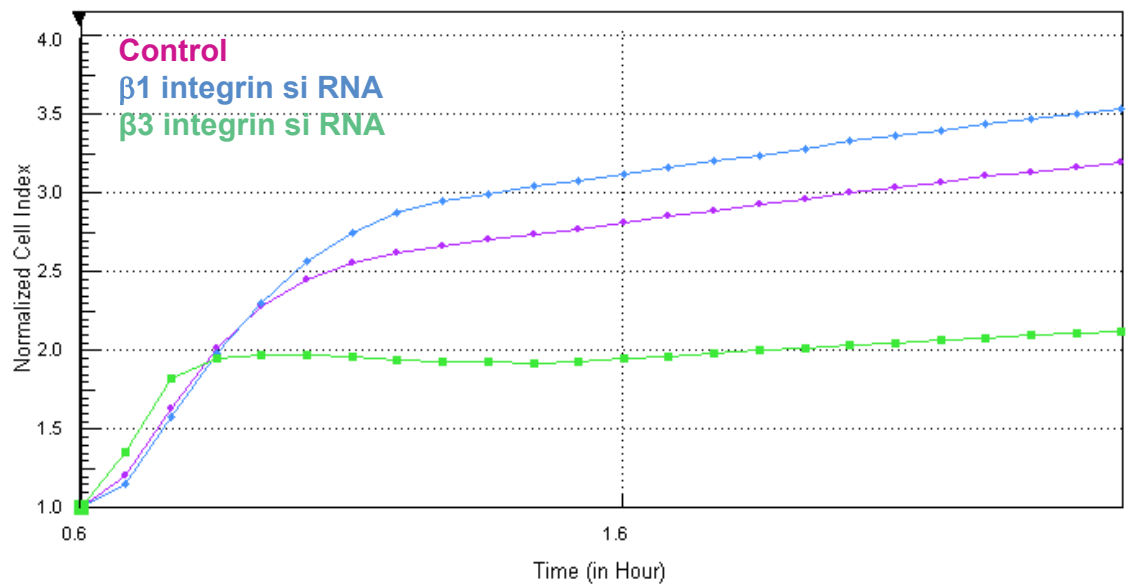
D

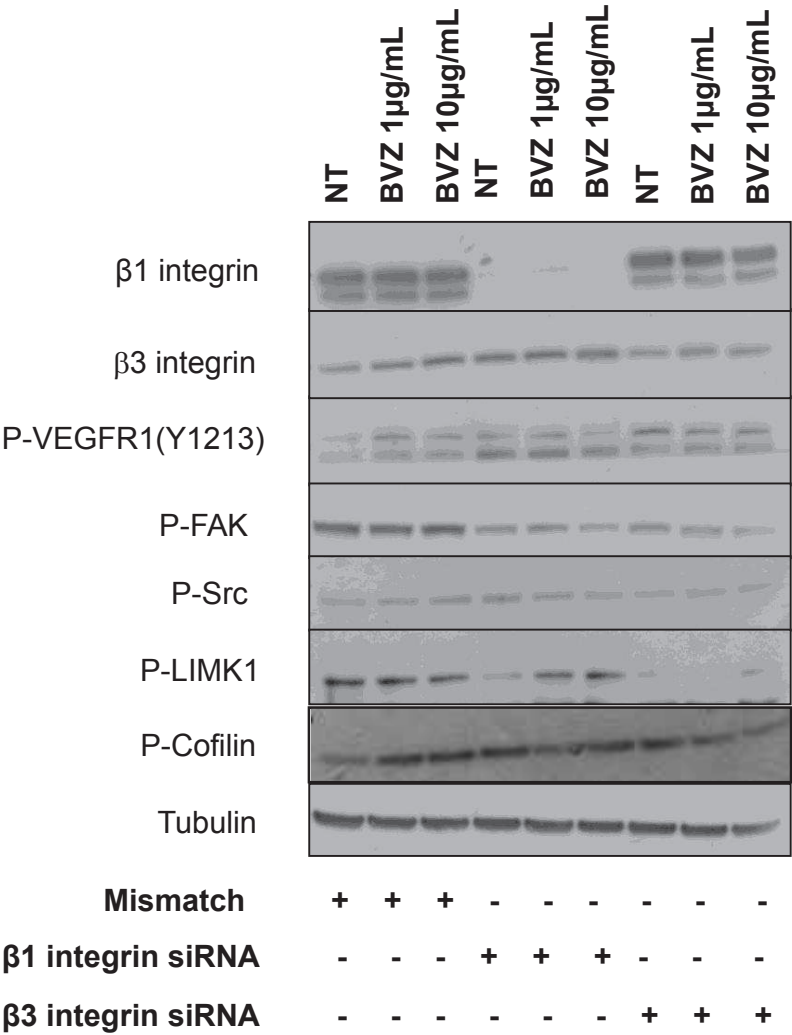


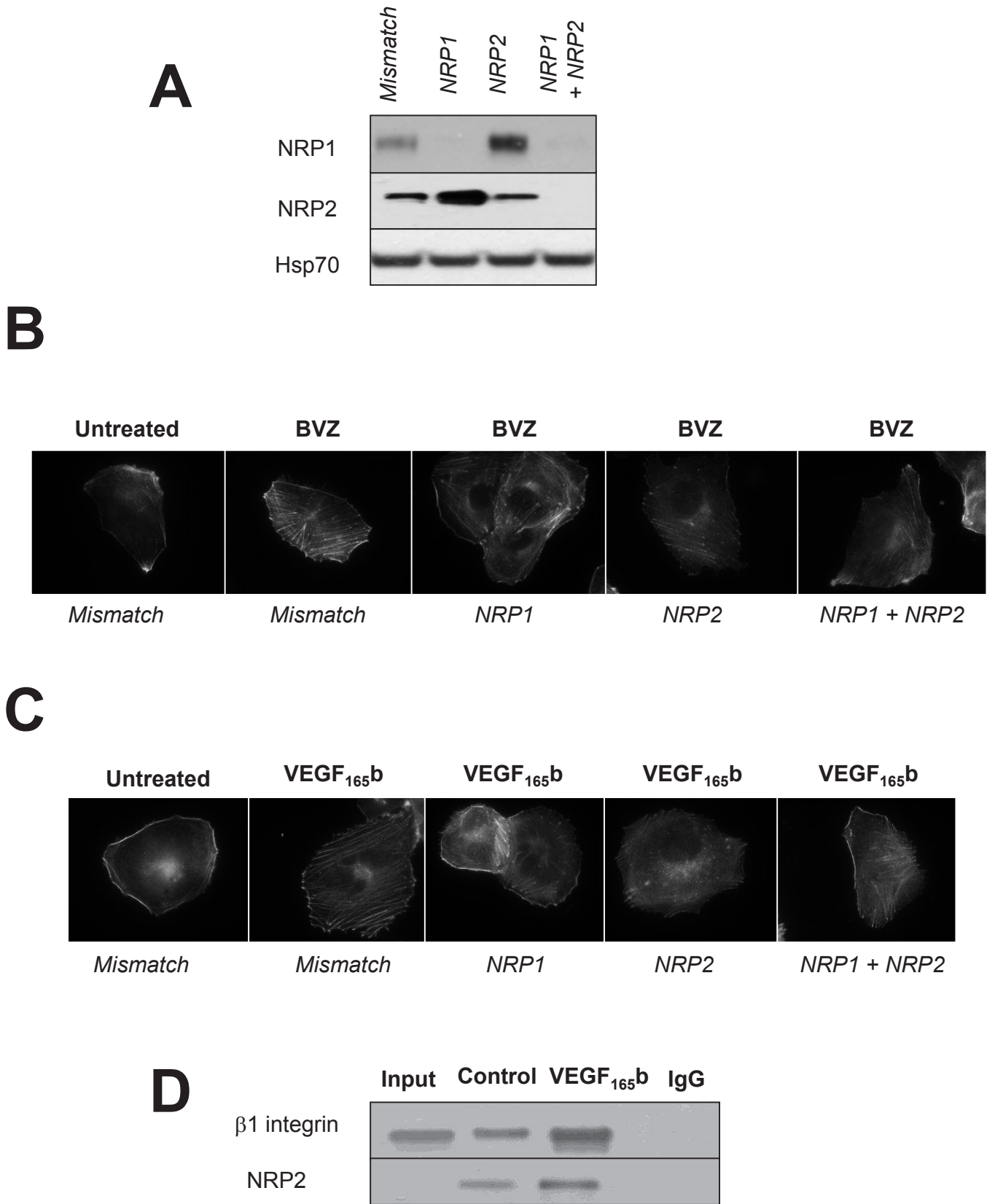
A



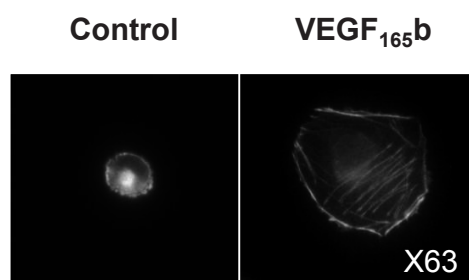
B



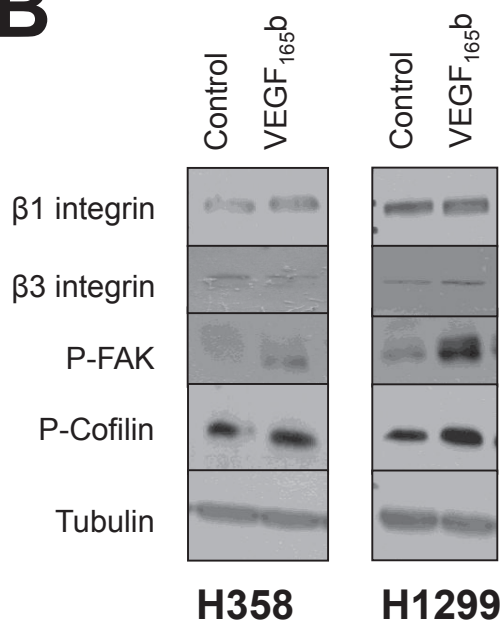




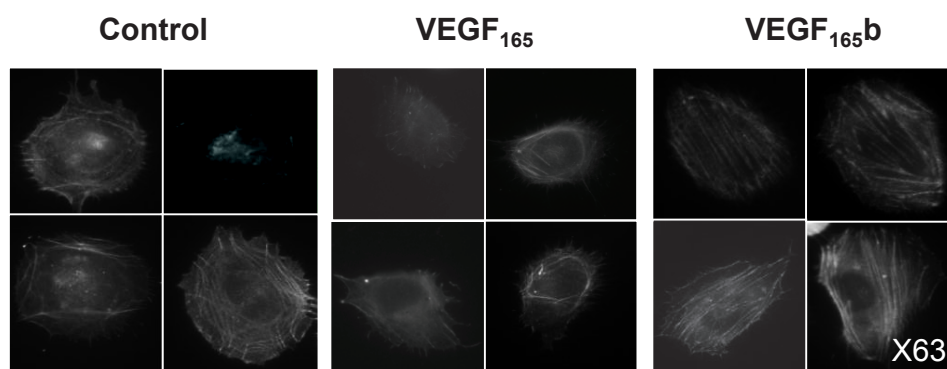
A



B

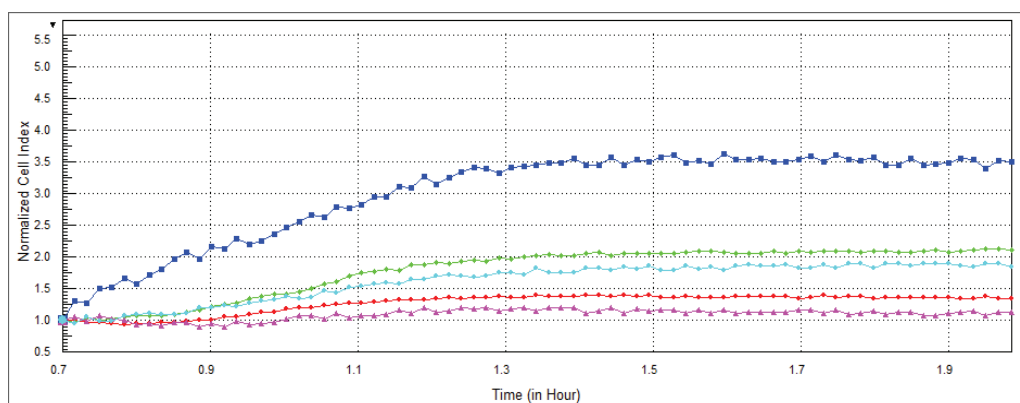


C

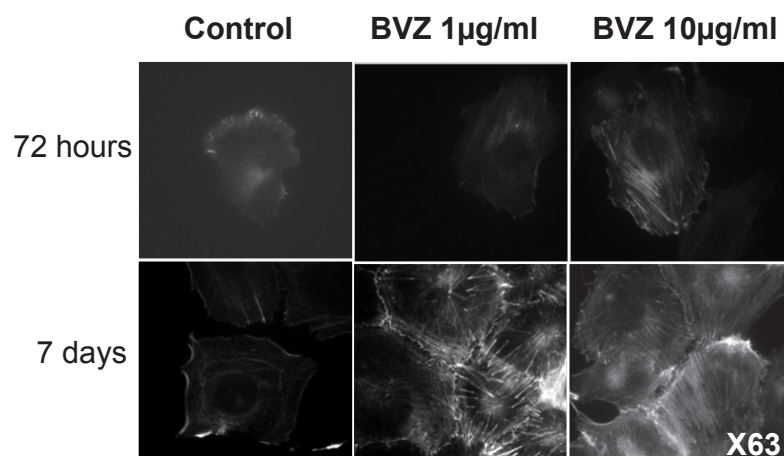


D

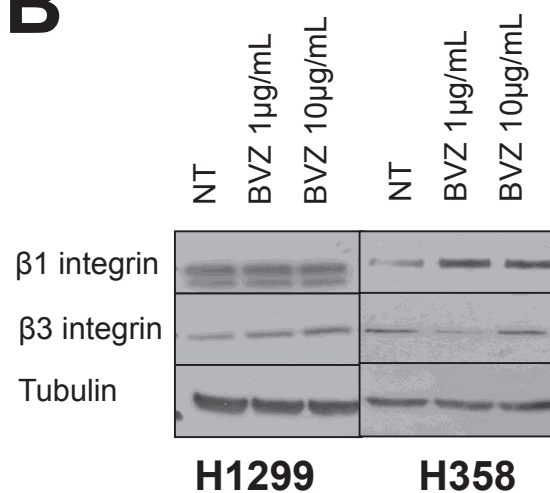
VEGF₁₆₅
VEGF₁₆₅ +ATN
VEGF_{165b}
VEGF_{165b} +ATN
Control



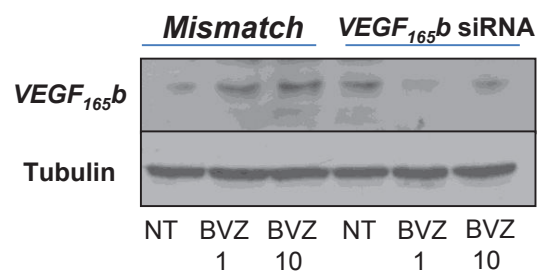
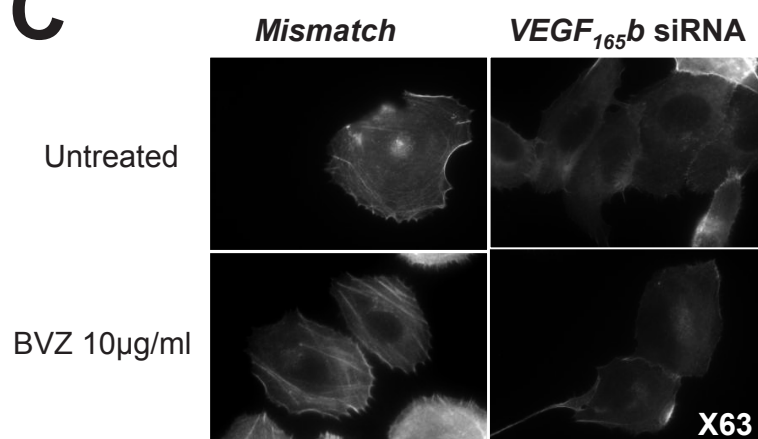
A



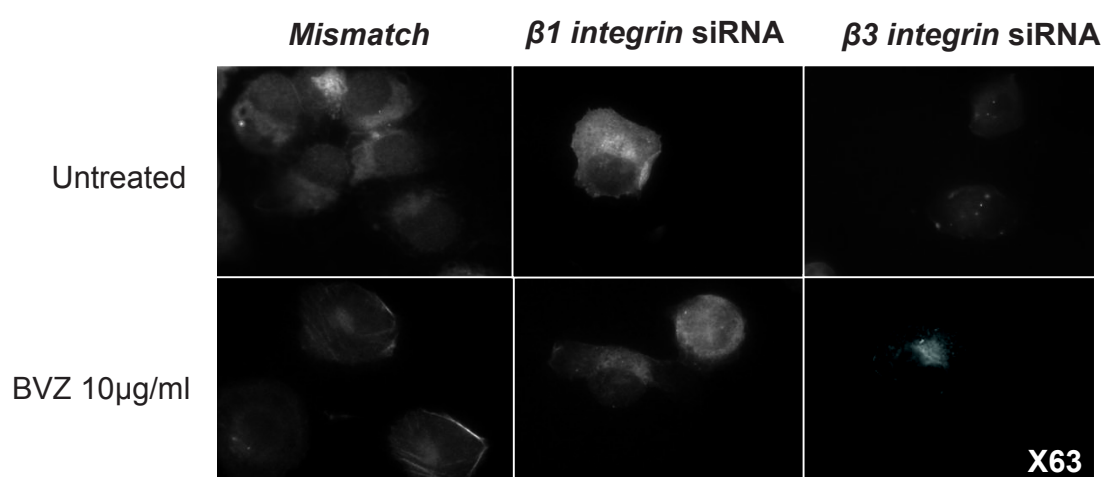
B



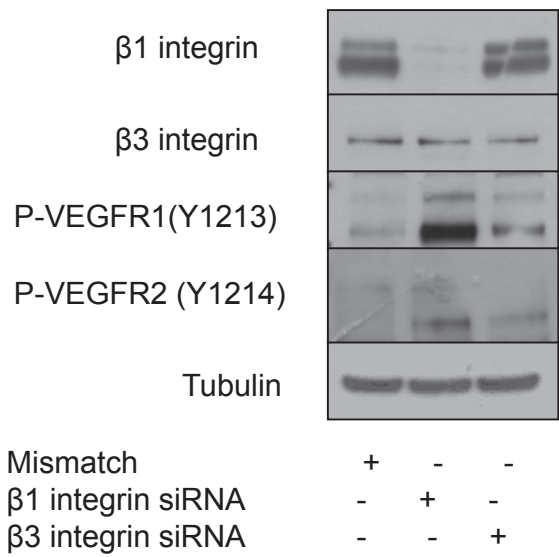
C



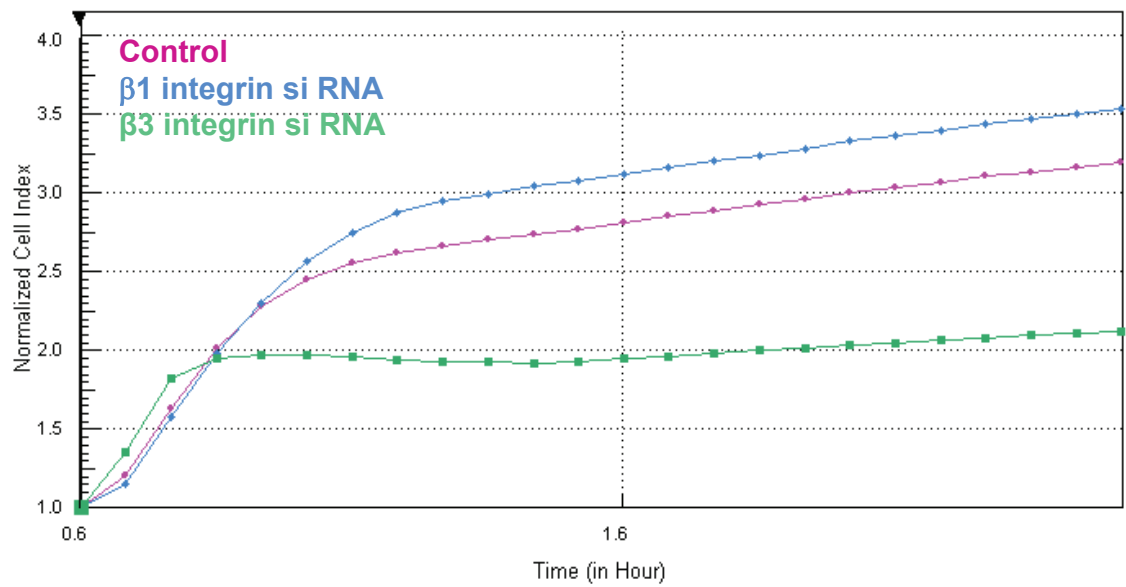
D

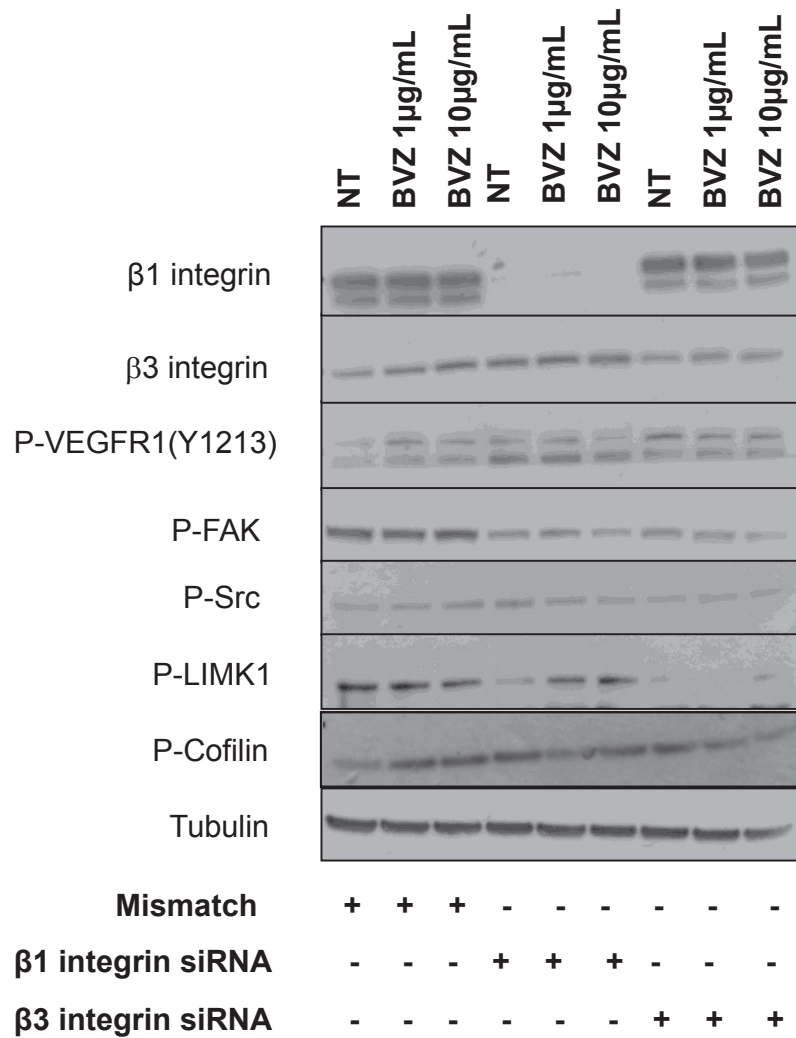


A



B





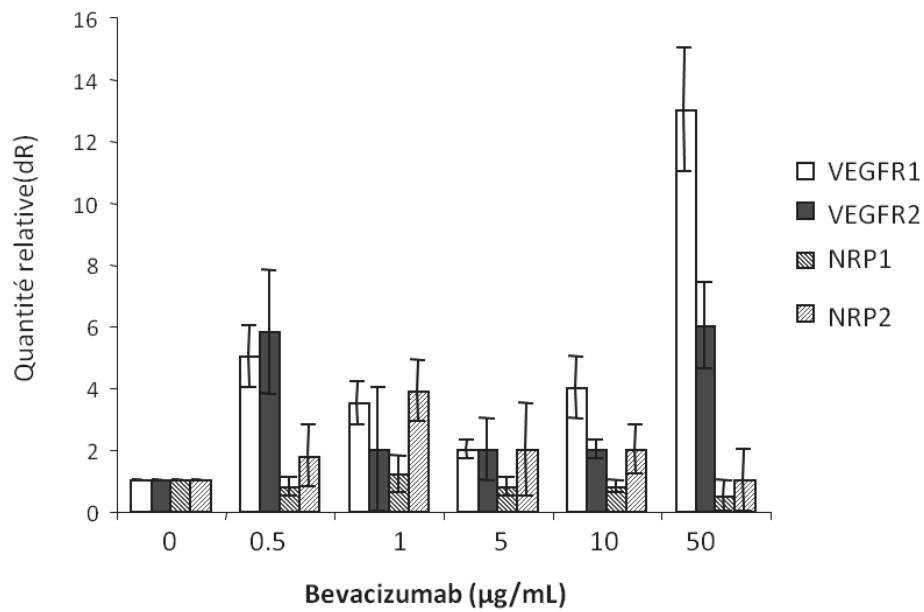
Résultats non publiés

Dans cette partie, j'ai ajouté certains des résultats que nous avons obtenus et qui ne sont pour le moment pas inclus dans les articles.

1. Les traitements par BVZ ou par VEGF₁₆₅b impactent sur l'expression des transcrits VEGFRs et NRPs

Parallèlement à nos expériences de western blot, nous avons effectué des RT-qPCR sur des extraits ARN provenant de la lignée H358 traitée ou non par des doses croissantes de BVZ. Nous montrons que le traitement par BVZ induit une augmentation significative des transcrits codant pour les VEGFR1 et VEGFR2 (Figure 27-A). Aucune variation significative suite à ce traitement n'a été constatée sur les transcrits *NRP1* et *NRP2*, certaines variations concernant le transcrit *NRP2* n'étant observées qu'à certaines doses et pas à d'autres. De manière intéressante, nos résultats montrent aussi que les ligands rhVEGF₁₆₅ et rhVEGF₁₆₅b modulent différemment l'expression des transcrits de ces récepteurs. Ainsi, le traitement par VEGF₁₆₅b augmente l'expression des transcrits VEGFR1 et VEGFR2, alors que le VEGF₁₆₅ n'induit aucune variation significative (Figure 27-B). En revanche, les deux ligands VEGF₁₆₅ et VEGF₁₆₅b sont capable d'augmenter les transcrits NRP1 et NRP2. Cependant, l'augmentation observée avec le VEGF₁₆₅b est supérieure, d'environ 3 fois pour la NRP1 et 4 fois pour la NRP2, à celle observée avec le VEGF₁₆₅ (Figure 27- B). Ces résultats sont en accord avec nos expériences de western-blot montrant une accumulation des protéines NRP1 et NRP2 en réponse au traitement par le rhVEGF₁₆₅b. Ils démontrent que le BVZ et le VEGF₁₆₅b régulent aussi l'expression des récepteurs VEGFR1, VEGFR2, NRP1 et NRP2 au niveau transcriptionnel.

A



B

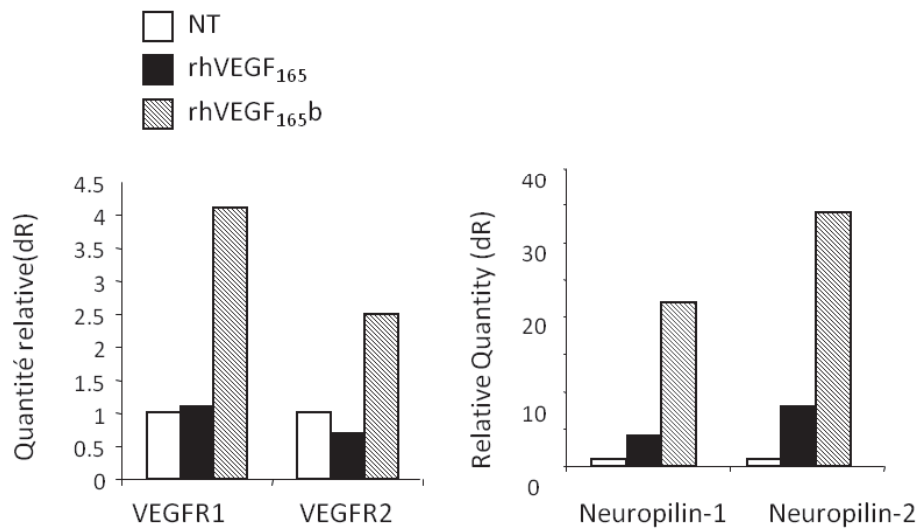


Figure 27. Variations des transcrits des VEGFRs et des NRPs après traitement au BVZ ou au VEGF_{165b}. (A) Les cellules ont été traitées 72h avec des doses croissantes de BVZ. Les niveaux de transcrits VEGFR1, VEGFR2, NRP1 et NRP2 ont été évalués par RT-qPCR. (B) Les cellules ont été traitées 72h soit au VEGF₁₆₅ (0.1ng/ml) soit au VEGF_{165b} (0.1 ng/ml). Les niveaux de transcrits VEGFR1, VEGFR2, NRP1 et NRP2 ont été évalués par RT-qPCR.

2. Le VEGF_{165b} ainsi que le BVZ induisent une modification des sécrétions de cytokines inflammatoires

Sur la base de nos résultats montrant un effet du BVZ sur la sécrétion des MMPs, nous avons voulu tester les effets du BVZ et du VEGF_{165b} sur l'expression de cytokines inflammatoires. De manière intéressante, nos résultats montrent qu'une diminution intra-cellulaire de l'expression d'ICAM-1 est observée lorsque des cellules H358 et H1299 naïves sont traitées au BVZ (Figure 28-A). Parallèlement, le traitement au BVZ induit aussi une diminution de l'interleukine-2 (IL-2) dans les deux lignées, et dans les cellules H358, une diminution du VEGF_{total} ainsi qu'une augmentation de l'IL-1ra. Dans les surnageants de culture des clones H358 et H1299 surexprimant l'isoforme VEGF_{165b}, nos résultats montrent que sur le panel de cytokines secrétées par nos cellules, la seule variation significative observée est une diminution d'ICAM-1 dans les clones surexprimant le VEGF_{165b} comparativement aux contrôles (Figure 28- B). Ces résultats indiquent que le traitement par BVZ et la surexpression de l'isoforme VEGF_{165b} modifient l'expression et la sécrétion de cytokines inflammatoires qui pourraient contribuer au processus d'échappement à ce traitement. De façon intéressante, dans l'essai clinique AVAIL analysant l'effet de combinaison sels de platine et BVZ, dans les CBnPCs, une faible expression plasmatique d'ICAM-1 a aussi été retrouvée dans les patients traités et a été corrélée à la durée de la réponse.

3. Le BVZ induit une sécrétion du VEGF-C dans les cellules de CBnPCs

Nous avons aussi effectué un dosage ELISA afin de déterminer les possibles variations de la sécrétion de VEGF-C dans nos modèles cellulaires. Nos résultats préliminaires démontrent que le traitement des cellules H358 par le BVZ augmente la sécrétion de VEGF-C dans le surnageant. Bien que les niveaux de base du VEGF-C soient assez élevés dans nos cellules, le traitement par la plus forte dose de BVZ (50 μ g/ml) augmente d'environ 30% la quantité de VEGF-C sécrétée (Figure 29). Nous n'avons pas regardé si les clones surexprimant le VEGF_{165b} sécrétaient aussi plus de VEGF-C mais sur la base de ces résultats préliminaires il serait intéressant de le faire.

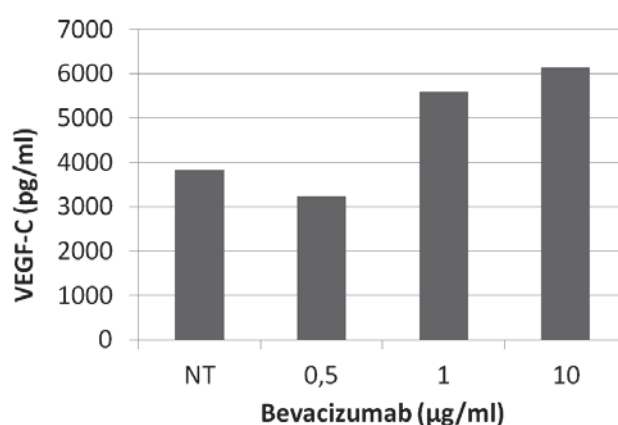


Figure 29. Mesure du VEGF-C dans le surnageant de cellules H358 traitées au BVZ. Les cellules H358 ont été traitées à doses croissantes de BVZ pendant 72h, puis le surnageant de ces cellules à été récupéré et le VEGF-C a été dosé par un test ELISA.

Cette augmentation de la sécrétion du VEGF-C dans le surnageant de culture pourrait favoriser la migration des cellules via une signalisation autocrine comme démontré dans les cancers ovariens « *in vitro* » où la voie VEGF-C/VEGFR3 jouerait un rôle important dans la progression de ces tumeurs (Decio et al., 2014).

4. Les cellules surexprimant le VEGF₁₆₅b sont résistantes à l'hypoxie

Compte tenu de l'importance de l'hypoxie dans le processus de néo-angiogénèse et la réponse aux thérapies, nous avons commencé à investiguer le rôle du VEGF₁₆₅b dans ce contexte. Nos résultats préliminaires révèlent que lorsque les clones surexprimant le VEGF₁₆₅b sont placés dans des conditions hypoxiques, ils continuent de proliférer et survivent plus longtemps que les clones contrôles. Notons que les différences entre les clones VEGF₁₆₅b sont moins importantes dans les clones dérivés de la lignée H358. Ces cellules sont, à la base ; très résistantes à l'hypoxie (Figure 30). A l'inverse, les clones H1299 surexprimant le VEGF₁₆₅b sont au moins 12 fois plus résistants que les clones contrôles. Ces résultats suggèrent que les cellules tumorales surexprimant le VEGF₁₆₅b pourraient échapper à l'hypoxie.

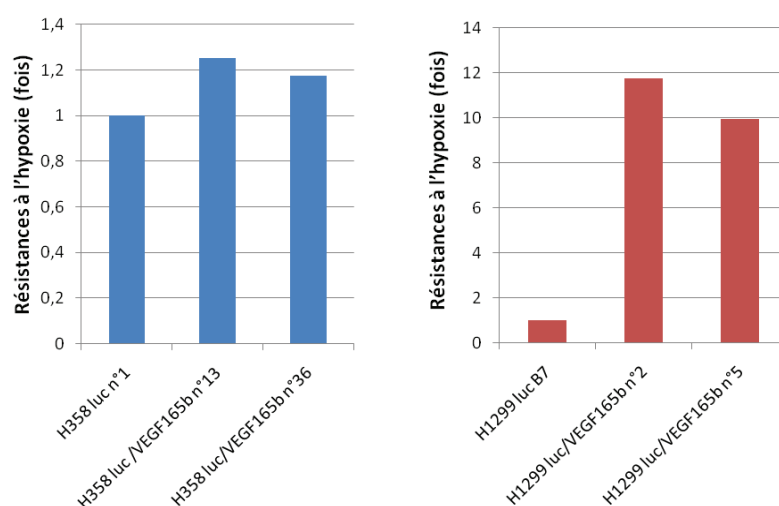


Figure 30 . Evaluation de la résistance à l'hypoxie *in vitro*. Les clones H1299 et H358 surexprimant le VEGF₁₆₅b et les clones contrôle ont été cultivés pendant 12 jours dans des conditions restrictives en nutriments (1% de Sérum de Veau Fœtal) et en oxygène (3%). Puis le nombre de cellules vivantes a été évalué. Le nombre de cellules dans les contrôles a été arbitrairement fixé à 1.

Combinés aux résultats décrits dans les 2 articles précédents, ces résultats supplémentaires sont donc aussi en faveur d'un rôle du BVZ et/ou du rhVEGF₁₆₅b dans la génération de cellules tumorales pulmonaires plus agressives (résistantes à hypoxie) et susceptibles de participer à l'échappement aux thérapies anti-angiogéniques (sécrétion de cytokines, sécrétion de VEGF-C).

5. Le VEGF_{165b} est détectable dans les sérums chez l'homme

Nous avons étudié par IHC l'expression intra-tumorale du VEGF_{165b} et démontré « *in vitro* » le rôle de cette isoforme dans la genèse de cellules tumorales dérivées de CBnPCs plus invasives. Un de nos objectifs dans la poursuite de ce travail serait de pouvoir valider « *in situ* » le rôle du VEGF_{165b} dans la réponse au BVZ chez les patients porteurs de CBnPCs. Nous n'avons pas accès à des échantillons tumoraux de patients porteurs de CBnPCs ayant été traités par une combinaison BVZ et sels de platine et pour lesquels la réponse au traitement est connue. De même, nous n'avons pas accès à des prélèvements tumoraux avant/après traitement. Nous ne pouvons donc pas évaluer par IHC l'expression intra-tumorale du VEGF_{165b} et la corrélérer à la réponse au traitement. Par contre, grâce à l'étude rétrospective Pharmacogenoscan (coordinateur principal : Pr Christian Brambilla ; CHU de Grenoble), nous avons accès à des sérums de patients porteurs de CBnPCs avant/après traitement, ayant été traités par sels de platine en association ou non avec du BVZ. Le dosage du VEGF-A dans le sérum comparativement au plasma est polémique. En effet, le taux sérique de VEGF-A serait uniquement le reflet du taux de plaquettes puisque les plaquettes relarguent le VEGF-A au moment de la coagulation. Comme mentionné dans l'introduction, les niveaux plasmatiques de VEGF-A ne sont pas corrélés à la réponse au BVZ (Hegde et al., 2013). De plus, ils ne sont pas corrélés au niveau intra-tumoral de VEGF-A. A l'inverse, une étude a montré dans les carcinomes hépatocellulaires que le niveau de VEGF-A sérique était corrélé au taux de plaquette, mais aussi au taux intra-tumoral de VEGF-A (Poon et al., 2003). Récemment, dans les CBnPCs, une étude a confirmé une corrélation entre les taux sériques de VEGF-A total et le taux de plaquettes. Cependant, dans cette étude, les taux sériques de VEGF_{165b} n'étaient pas corrélés aux taux de plaquette. Ces résultats nous incitent à poursuivre l'analyse du VEGF_{165b} dans les sérums de patients.

Afin de savoir si nous arrivions à doser du VEGF_{165b} dans le sérum, nous avons effectué un dosage ELISA du VEGF_{165b} et du VEGF_{total} dans les sérums de donneurs sains (se référer à la section matériel et méthode de l'article 1). Nous montrons que le VEGF_{165b} est détectable dans les sérums humains et qu'il y est présent à des taux variables allant de 49,62 à 197,21 pg/ml (Figure 31-A), la médiane des valeurs détectées étant de 135,27 pg/ml. Le dosage du VEGF_{total} a lui aussi démontré des valeurs variables allant de 39,83 à 1019,66 pg/ml (Figure 31-B), avec une médiane des valeurs de 171,69 pg/ml. Il est intéressant de noter que les sérums contenant les taux les plus élevés de VEGF_{total} n'ont pas forcément ceux ayant des taux

élevés de VEGF_{165b} comme le montre le calcul des ratios VEGF_{165b}:VEGF_{total} (Figure 31-C). Nos résultats montrent qu'il existe des variabilités inter-individuelles dans les taux de VEGF_{165b} et de VEGF_{total} avec des individus chez qui le VEGF_{165b} serait majoritaire et d'autres chez qui il serait minoritaire. En comparant les moyennes des deux dosages, le VEGF_{165b} représenterait 48,92% du VEGF_{total}.

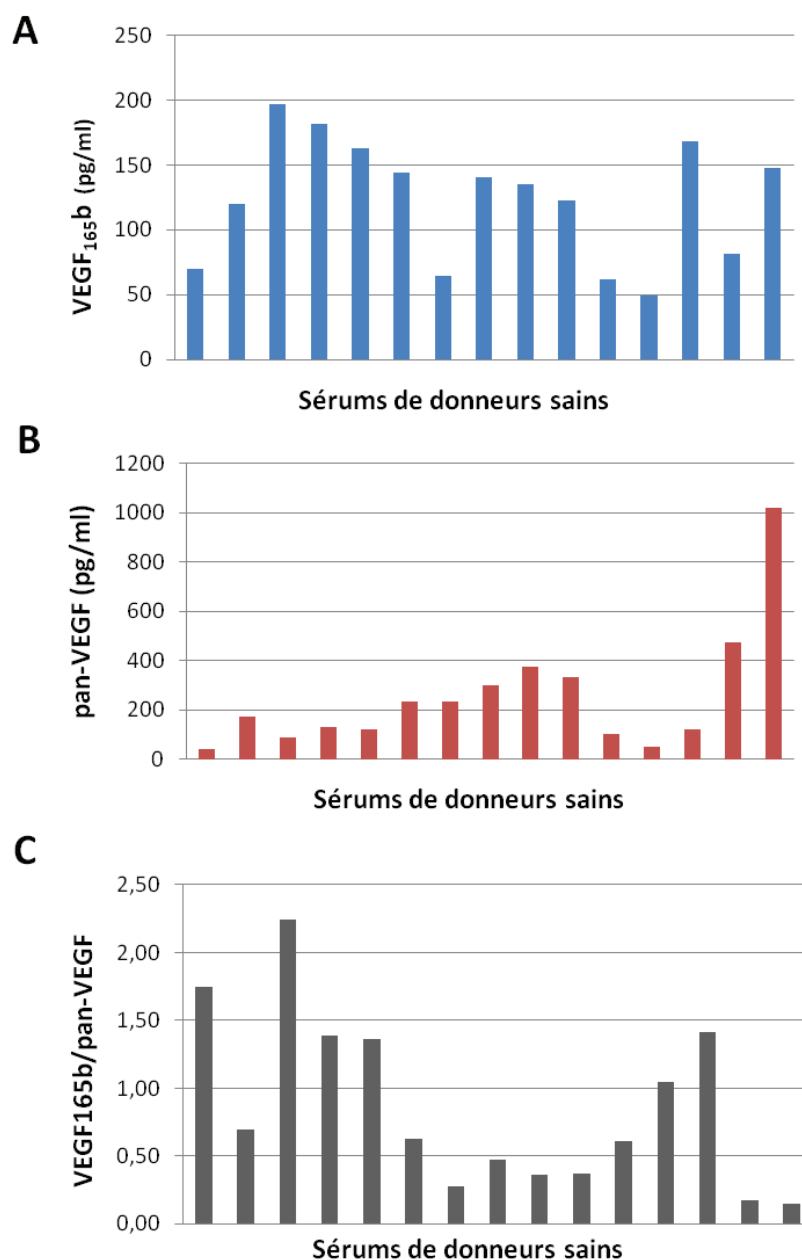


Figure 31. Taux de VEGF_{165b} et de VEGF_{total} dans les sérums humains provenant de donneurs sains. (A) Dosage ELISA du VEGF_{165b}. (B) Dosage ELISA du VEGF_{total}. (C) Ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total}

6. Génération d'un anticorps spécifique de l'isoforme VEGF₁₆₅

Au cours de notre étude, pouvoir dissocier les deux isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} est devenu une nécessité. En effet, suite aux résultats montrant que ces deux isoformes ont des effets opposés sur les cellules de CBnPCs, et suite à la découverte surprenante des effets pro-apoptotiques du VEGF₁₆₅, nous nous questionnons sur le fait que cette isoforme puisse être exprimée par des cellules sur lesquelles elle exercerait des effets apoptotiques. Au départ, nous avons voulu utiliser l'anticorps anti-VEGF₁₆₅ (MAB193) de chez R&D Systems. Cependant, nous avons montré que cet anticorps reconnaît de la même façon les protéines recombinantes rhVEGF₁₆₅ et rhVEGF_{165b} (Figure 33-A). Les outils disponibles ne permettant pas de dissocier ces deux fractions du VEGF-A, nous avons eu recours aux services d'une entreprise permettant de créer des anticorps à façon, la société Covalab.

Comme décrit précédemment, l'isoforme VEGF₁₆₅, comme toutes les isoformes pro-angiogéniques du VEGF-A, est caractérisée par 6 acides aminés spécifiques en C-terminal constituant la séquence **CDKPRR**. C'est donc contre ce fragment que nous devions générer un anticorps. Cependant, cette séquence étant trop courte et donc peu immunogène, nous avons décidé d'y intégrer les 10 derniers acides aminés encodés par l'exon 7 et contenus dans le VEGF₁₆₅. L'immunisation des lapins s'est faite en deux étapes principales (Figure 32). Premièrement, le peptide long de 16 aminés dont la séquence est « **QLELN ERTCR CDKPRR** » a été injecté par voie intradermique, puis après 53 jours, le sérum de lapin a été testé et montrait une bonne réactivité pour le recombinant VEGF₁₆₅. Une seconde injection du peptide court « **CDKPRR** » a été réalisée afin d'accroître la spécificité de l'anticorps. Les lapins ont été sacrifiés au bout de 90 jours, les sérums ont été récupérés et immunopurifiés. Nos tests sur l'anticorps ont montré qu'il était bien spécifique du VEGF₁₆₅ (figure 33-B) et qu'il ne croisait pas avec le VEGF_{165b}. Cependant, la première immunisation ayant été opérée en utilisant le peptide long dont la séquence est commune à certaines isoforme VEGF_{xxx}, il est apparu que cet anticorps reconnaissait aussi le VEGF₁₈₉ (Figure 33-C) mais pas le VEGF₁₂₁ qui ne contient pas l'exon 7 (Figure 33-C). A l'inverse, l'anticorps anti-VEGF_{165b} est bien spécifique du rhVEGF_{165b}.

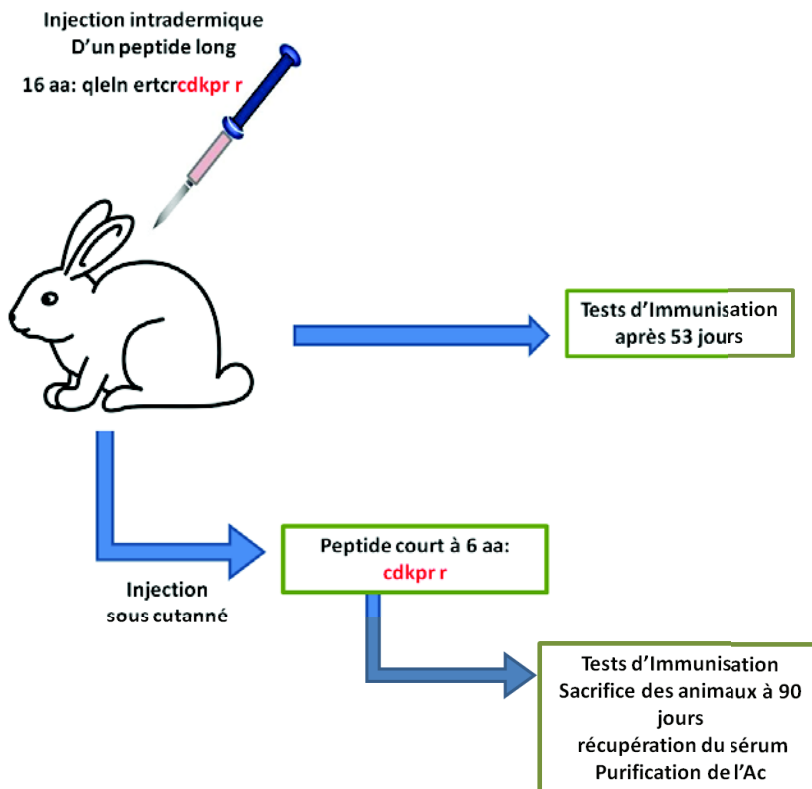


Figure 32. Organigramme d'immunisation des lapins pour l'obtention de l'anticorps VEGF₁₆₅.

Une fois cet outil acquis, notre première démarche a été de vérifier si l'expression du VEGF₁₆₅ était aussi affectée par le traitement au BVZ, et si notre ARN interférent ciblant l'isoforme VEGF_{165b} était bien spécifique de l'isoforme VEGF_{165b}. Nos résultats montrent qu'en réponse au BVZ, seule l'expression du VEGF_{165b} est augmentée, et que sous l'action de l'ARN interférent neutralisant le VEGF_{165b}, l'expression du VEGF₁₆₅ n'est pas affectée (Figure 33-D).

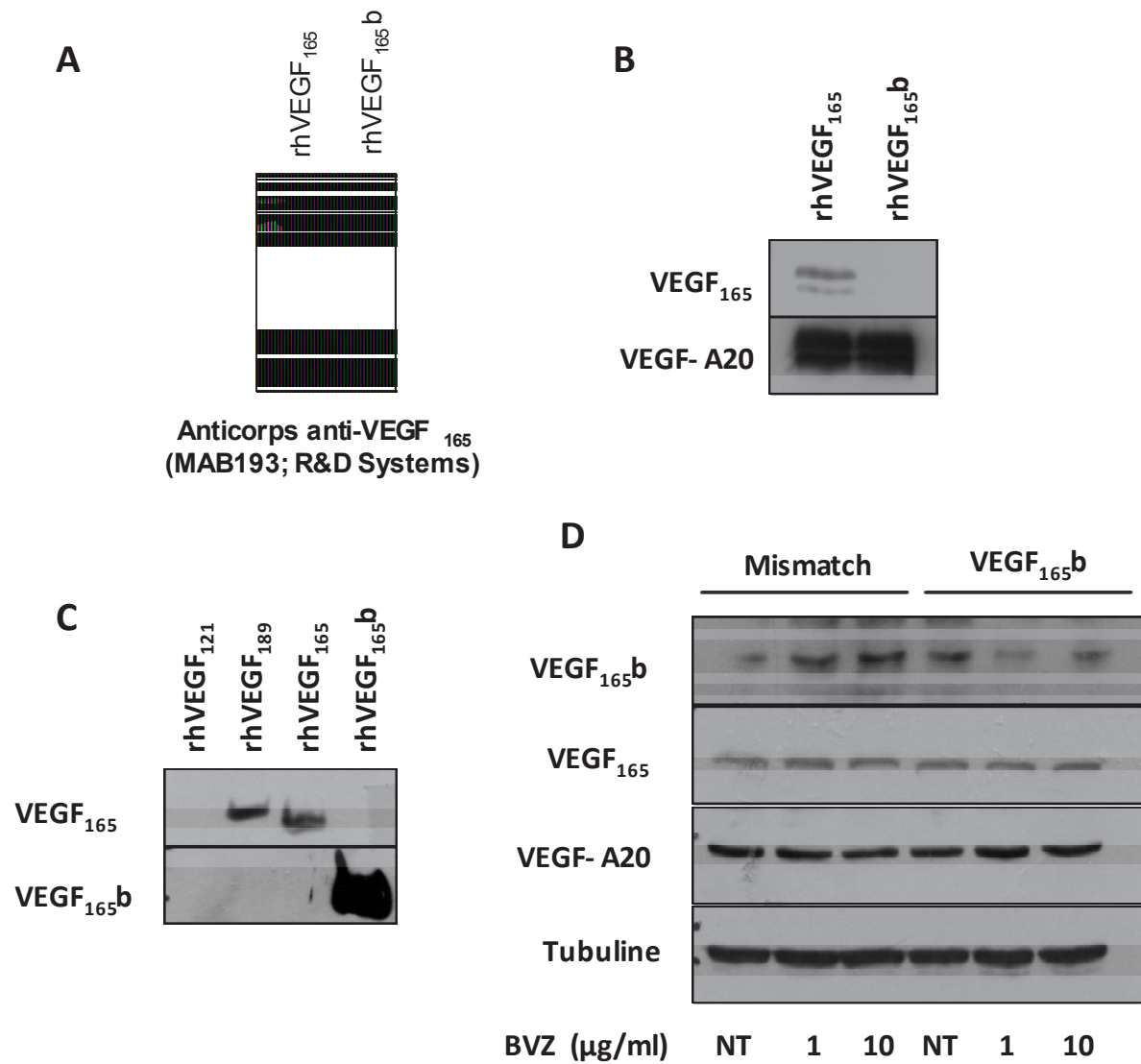


Figure 33. Tests de réactivité de l'anticorps anti-VEGF₁₆₅. (A) Nous avons testé la réactivité croisée de l'anti-VEGF₁₆₅ (MAB193) de chez R&D Systems. (B) Nous avons testé par western-blot la réactivité croisée de l'anti-VEGF₁₆₅ avec le VEGF_{165b}. (C) Nous avons testé par western-blot la réactivité croisée de l'anti-VEGF₁₆₅ avec les isoformes VEGF₁₈₉ et VEGF₁₂₁ de la même famille. (D) Western-blot réalisé sur des extraits de cellules H1299 traitée ou non au BVZ pendant 72h et transfectées avec soit un si ARN contrôle soit un siARN ciblant le VEGF_{165b}.

Discussion générale

Discussion générale

I. Expression des isoformes VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b dans les tumeurs humaines : rôle dans la progression des CBnPCs

I.1. Les isoformes du VEGF_{xxx}b : un rôle et une existence controversés

Depuis leur découverte en 2002, les isoformes VEGF_{xxx}b ont suscité de nombreux questionnements principalement concernant leurs fonctions biologiques. Leurs effets sur les cellules endothéliales ont été largement décrits, leur rôle en tant que régulateurs de l'angiogenèse a donc immédiatement capté l'intérêt de la communauté scientifique qui a vu dans ces isoformes un traitement potentiel pour des pathologies résultant de troubles de l'angiogenèse ou pour celles hautement dépendantes de ce processus. Cependant, pour certains, la question de leur existence et de leur réelle fonction anti-angiogénique se pose toujours. Notamment, leur existence chez la souris et le rat demeure controversée puisque très peu d'études ont analysé leur statut chez ces animaux (Ergorul et al., 2008 ; Artac et al., 2009 ; Zhao et al., 2011). Une des explications à la difficulté à détecter ces isoformes chez les rongeurs pourrait être liée au fait que la balance d'expression entre les isoformes VEGF_{xxx}b et VEGF_{xxx} augmente au cours de l'évolution entre les souris, lapins, singes et humains (Xu et al., 2011). Un autre souci concernant la détection de ces isoformes repose sur le peu d'outils actuellement disponibles pour les détecter. Les principales techniques décrites jusqu'à présent sont l'amplification spécifique des transcrits VEGF_{xxx}b par RT-PCR ou RT-QPCR en utilisant des amorces spécifiques de l'exon 8b ou de l'extrémité 3'UTR, et des études par ELISA, immunohistochimie ou western blot en utilisant le seul anticorps anti-VEGF₁₆₅b commercial disponible. Concernant la détection de ces isoformes par RT-PCR ou RT-qPCR, Harris et collaborateurs ont rapporté leur difficulté à amplifier spécifiquement les transcrits *VEGF_{xxx}b* en raison du mésappariement des primers sensés détecter spécifiquement les transcrits *VEGF_{xxx}b* sur les transcrits *VEGF_{xxx}* (Harris et al., 2012). Ils ont aussi remis en question la détection protéique des isoformes VEGF_{xxx}b et notamment chez la souris. Comme discuté par Bates ensuite en réponse à ce papier provocateur (Bates et al., 2013), la difficulté de détecter

spécifiquement les transcrits *VEGF_{xxx}b* par PCR pourrait dépendre des primers utilisés, des conditions d'amplification mais aussi de différence de structures de l'extrémité 3'UTR entre les transcrits *VEGF_{xxx}* et *VEGF_{xxx}b*. Au cours de nos études, nous avons nous aussi eu du mal à reproduire des variations concernant la détection spécifique des transcrits *VEGF_{xxx}b*. C'est pourquoi, nous nous sommes finalement axés sur l'analyse du VEGF₁₆₅b par western-blot, immunohistochimie ou ELISA en utilisant l'anticorps anti-VEGF₁₆₅b commercialisé par R&D. Nous avons d'abord vérifié que cet anticorps reconnaissait spécifiquement la protéine recombinante VEGF₁₆₅b mais pas la protéine recombinante VEGF₁₆₅ par western blot. Par ces différentes techniques, nous avons ensuite pu détecter une expression de la protéine VEGF₁₆₅b dans les extraits cellulaires et des surnageants de différentes lignées cellulaires dérivées de CBnPCs, mais aussi « *in situ* » dans les CBnPCs. De plus, l'utilisation d'un ARN interférent ciblant spécifiquement le transcrit *VEGF₁₆₅b* au niveau de la jonction exon 7 / exon 8b nous a permis de montrer une diminution spécifique de l'isoforme VEGF₁₆₅b détectée par l'anticorps anti-VEGF₁₆₅b. Néanmoins, là encore, des questions restent posées. En effet, nous avons observé des différences entre la détection du VEGF₁₆₅b par ELISA et par western blot, principalement dans les clones surexprimant l'isoforme VEGF₁₆₅b. En effet, dans ces clones, et comparativement aux clones contrôle, les concentrations de VEGF₁₆₅b détectées par ELISA dans les surnageants sont très importantes, mais l'augmentation de la protéine détectée par western blot dans les extraits cellulaires bien que significative l'est moins. Une des possibilités pourrait être que la majorité du VEGF₁₆₅b produit dans ces clones est sécrétée. Une autre possibilité est une variabilité de détection conditionnée par l'utilisation de techniques non dénaturantes (ELISA) ou dénaturantes (western-blot). Bien que nos travaux démontrent l'existence du VEGF₁₆₅b dans les CBnPCs, confirmant ainsi d'autres études parues dans d'autres modèles tumoraux, ils renforcent néanmoins la nécessité de développer de nouveaux outils pour l'étude spécifique de ces isoformes.

Parallèlement à l'existence des isoformes VEGF_{xxx}b, une autre controverse est basée sur la réalité de leur activité anti-angiogénique. Ainsi, Catena et collaborateurs ont proposé que l'isoforme VEGF₁₆₅b ne soit pas anti-angiogénique mais moins pro-angiogénique que l'isoforme VEGF₁₆₅ (Catena et al., 2010). Dans notre travail, nous n'avons pas étudié l'effet de l'isoforme VEGF₁₆₅b sur les cellules endothéliales. Par contre, nous avons pu montrer que des clones surexprimant le facteur d'épissage SRSF6 et produisant plus de VEGF₁₆₅b prévenaient la capacité de cellules HUVEC à former des néotubes en matrigel. Ces clones

surexprimant sans doute bien d'autres facteurs que le VEGF_{165b}, il serait intéressant de réitérer ces expériences en neutralisant par ARN interférence l'expression du VEGF_{165b}. De plus, dans une étude précédente, nous avons montré chez la souris nude que des xénogreffes dérivées de cellules surexprimant la protéine SRSF2 et donc l'isoforme VEGF_{165b} étaient moins néo-angiogéniques que les tumeurs contrôle (Merdzhanova et al., 2010). Pris ensemble, ces résultats vont donc dans le sens d'un effet anti-angiogénique de l'isoforme VEGF_{165b}. Pourtant, malgré cet effet anti-angiogénique, nous avons montré qu'à plus long terme les tumeurs surexprimant SRSF6 poussent plus vite. A la fin de l'expérience, nous n'avons pas observé de différence entre les tumeurs contrôle et les tumeurs surexprimant SRSF6 en ce qui concerne leur néovascularisation, quantifiée par marquage CD31 ou α -SMA. Ces résultats suggèrent que la croissance accélérée de ces tumeurs n'est pas liée à un effet sur l'angiogenèse. Comme nous le discuterons plus loin, l'activité anti-angiogénique anti-tumorale du VEGF_{165b} pourrait donc être surpassée par une activité pro-proliférative pro-tumorale, expliquant les controverses existant entre certaines études rapportant soit un effet anti-angiogénique ou moins pro-angiogénique. De plus, ces effets du VEGF_{165b} sur l'angiogenèse et/ou la prolifération des cellules tumorales pourraient expliquer pourquoi l'on observe soit une diminution, soit une augmentation de son expression dans certaines tumeurs, comparativement aux tissus sains.

I.2. Quelles sont les isoformes VEGF_{xxx} qui sont réellement exprimées dans les cancers du poumon ?

Comme décrit précédemment, les outils disponibles jusque là, ne permettaient pas de faire la distinction entre les variants issus de l'épissage alternatif au niveau de l'exon 8 du VEGF-A. De plus, jusqu'alors, la plupart des études réalisées par immunohistochimie dans les tumeurs humaines utilisaient un anticorps anti-pan VEGF-A (principalement anticorps A20, Santa Cruz) reconnaissant toutes les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b. On ne sait donc pas encore quelles sont les isoformes VEGF_{xxx} réellement exprimées à l'échelle protéique dans les cellules de CBnPCs. De façon importante, nous avons montré par immunohistochimie dans notre série de CBnPCs que l'expression du VEGF-A total ne corrélait pas avec l'expression du VEGF_{165b}, indiquant la nécessité de développer des outils spécifiques à chacune des isoformes. Sur la base de l'étude des ARNs, des modèles mathématiques prédictifs

récemment publiés suggèrent que les CBnPCs exprimeraient majoritairement l'isoforme la plus diffusible, le VEGF₁₂₁, au détriment des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉ (Vempati et al. 2013). Ces prédictions sont impossibles à vérifier pour l'instant, car nous ne disposons pas d'anticorps capables de détecter spécifiquement le VEGF₁₂₁. Bien que l'on ne connaisse pas exactement la corrélation existant entre le niveau d'expression des transcrits VEGF_{xxx} et le niveau d'expression des protéine VEGF_{xxx}, ces prédictions vont aussi dans le sens de nos expériences « *in vitro* » démontrant que l'isoforme VEGF₁₆₅ induit l'apoptose de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires. Cependant, nous avons obtenu des résultats préliminaires avec l'anticorps que nous avons développé et qui reconnaît spécifiquement les isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉. Nous avons pu constater que l'expression de l'isoforme VEGF₁₆₅ était effectivement très faible dans les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires comparativement aux autres sous-types histologiques. Paradoxalement, ce sont les adénocarcinomes qui montrent les niveaux les plus élevés de VEGF_{total}. Ce qui signifie que le VEGF₁₆₅ ne constitue qu'une fraction minoritaire du VEGF-A exprimé par nos modèles cellulaires et que, contrairement à ce qui a été décrit dans d'autres types de cancers, la signalisation dépendante de cette isoforme ne serait pas impliquée dans la promotion des adénocarcinomes pulmonaires. Un des objectifs dans la poursuite de ce travail serait donc d'étudier dans la même série de CBnPCs que celle que nous avons étudiée, l'expression des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉. Plus généralement, une étude plus approfondie de l'expression des différents variants d'épissage du VEGF-A dans différents modèles tumoraux permettrait de savoir quelles isoformes sont réellement exprimées dans les tumeurs et de pouvoir évaluer leur contribution réelle dans le développement tumoral.

I.3. Un switch entre les isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b : au delà du switch angiogénique

Du fait de son action inhibitrice de l'angiogenèse, l'expression du VEGF₁₆₅b a été associée à un bon pronostic dans certains types tumoraux. D'ailleurs, lors d'une précédente étude, nous avons démontré que des xénogreffes dérivées de CBnPCs et exprimant des niveaux élevés de VEGF₁₆₅b ont une néovascularisation diminuée (Merdzhanova et al., 2010). Cependant, dans cette étude, nous ne nous étions intéressés qu'à la phase précoce d'établissement des tumeurs (7 jours après le début de la prise tumorale). En contre partie, les résultats de la présente étude

démontrent que le VEGF_{165b} favorise à plus long terme le développement des tumeurs de CBnPCs, et ce de manière indépendante de l'angiogenèse. « *In situ* », dans les adénocarcinomes pulmonaires, nos résultats démontrent aussi que l'expression élevée de cette isoforme serait délétère puisqu'elle est associée à l'envahissement ganglionnaire. Nous proposons que cet effet du VEGF_{165b}, dans la promotion et dans la progression tumorale à travers une action autocrine et de façon indépendante de l'angiogenèse, est lié au fait que les cellules de CBnPCs sont caractérisées par l'expression concomitante des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, ainsi que de celles des corécepteurs NRP1 et NRP2. Cette particularité des CBnPCs pourrait impliquer que les effets du VEGF_{165b} soient prédominants sur la boucle de signalisation autocrine, ce qui fait de lui un facteur important de survie et de prolifération des cellules tumorales. L'action du VEGF_{165b} aurait donc une importance moindre dans le cadre d'une signalisation paracrine faisant passer son rôle de facteur anti-angiogénique au second plan dans le développement des adénocarcinomes pulmonaires.

Dans les adénocarcinomes pulmonaires, le VEGF-A est capable de stimuler sa propre expression à travers une signalisation dépendante des voies VEGFR2/mTOR (Chatterjee et al., 2013). Dans cette étude, un taux plus élevé de VEGF lié au VEGFR2 a été détecté dans les cellules des tumeurs les plus vascularisées « *in situ* ». Cependant, l'isoforme du VEGF-A réellement lié au VEGFR2 dans ce contexte n'a pas été caractérisée. De façon intéressante, dans la même étude, les auteurs ont observé que le traitement des cellules dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires par le VEGF₁₆₅ inhibait l'activation des voies AKT et ERK, alors qu'un inhibiteur pharmacologique du VEGFR2 activait ces mêmes voies. Ces résultats démontrent que, bien que l'isoforme VEGF₁₆₅ soit nécessaire à l'établissement d'un réseau vasculaire à travers son action paracrine promotrice de la survie et de la migration des cellules endothéliales, ses effets autocrines semblent aller dans le sens inverse. Les résultats de cette étude sont en accord avec les nôtres qui démontrent que le VEGF₁₆₅ induit une diminution de la phosphorylation de ERK et de p38MAPK. Dans une autre étude, réalisée dans les carcinomes pulmonaires squameux, de hauts niveaux de VEGF-A associés à de hauts niveaux d'expression des VEGFR1 et VEGFR2 représentent un facteur de bon pronostic (Pajares et al., 2012). Les résultats découlant de ces deux études montrent d'une part, que l'isoforme VEGF₁₆₅ n'exerce pas uniquement des fonctions prolifératives dans les tumeurs, et d'autre part, que l'expression de cette isoforme dans des cellules possédant les VEGFRs n'est pas

forcément délétère pour les patients. Ces résultats sont en accord avec la fonction pro-apoptotique sur les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires que lui attribuent nos résultats.

Finalement, comment réconcilier tous ces résultats montrant un effet pro-angiogénique et anti-tumoral du VEGF₁₆₅ et un effet anti-angiogénique et pro-tumoral du VEGF_{165b} ? Une théorie qui permettrait d'expliquer les effets différentiels exercés par les deux familles d'isoformes sur les cellules endothéliales et sur les cellules tumorales serait celle d'un « switch » entre isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b au cours de la progression tumorale (Figure 34). Le rôle pro-angiogénique du VEGF₁₆₅ sur les cellules endothéliales est aujourd'hui bien établi. Ainsi, les résultats de Chatterjee et collaborateurs montrent qu'une signalisation autocrine contrôlée par cette isoforme et active dans les cellules tumorales exprimant de hauts niveaux de VEGFR2 est requise pour l'établissement d'un réseau vasculaire tumoral « *in vivo* ». Chronologiquement, les tumeurs commencent dans une première phase par mettre en place un réseau vasculaire leur permettant de croître. Pour cela, elles exprimeraient majoritairement l'isoforme VEGF₁₆₅, ce qui permettrait d'une part, d'induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que l'organisation des vaisseaux, et d'autre part, d'induire une phase de quiescence tumorale à travers une inhibition de la prolifération des cellules tumorales médiée par une inhibition de la signalisation dépendante des VEGFRs. Par la suite, une fois le réseau vasculaire établi et dans une seconde phase du développement tumoral, le switch des isoformes ferait pencher la balance en faveur de l'isoforme VEGF_{165b}. Il n'est pas impossible que d'autres isoformes VEGF_{xxx} prennent alors le relais de l'isoforme VEGF₁₆₅ à ce stade. Parallèlement, l'isoforme VEGF_{165b} va induire la prolifération des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires à travers l'activation d'une boucle de signalisation autocrine dépendante des VEGFRs. Nous possédons au laboratoire un modèle murin développant des adénocarcinomes pulmonaires, le modèle KRasV12. Dans ce modèle, il serait donc intéressant de rechercher l'existence d'un tel « switch » au cours du développement tumoral et notamment de comparer les niveaux d'expression des isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} dans les lésions préneoplasiques. Comme discuté précédemment, le problème qui se pose à cette étape est celui de l'utilisation d'un anticorps anti-VEGF_{165b} relevant chez la souris.

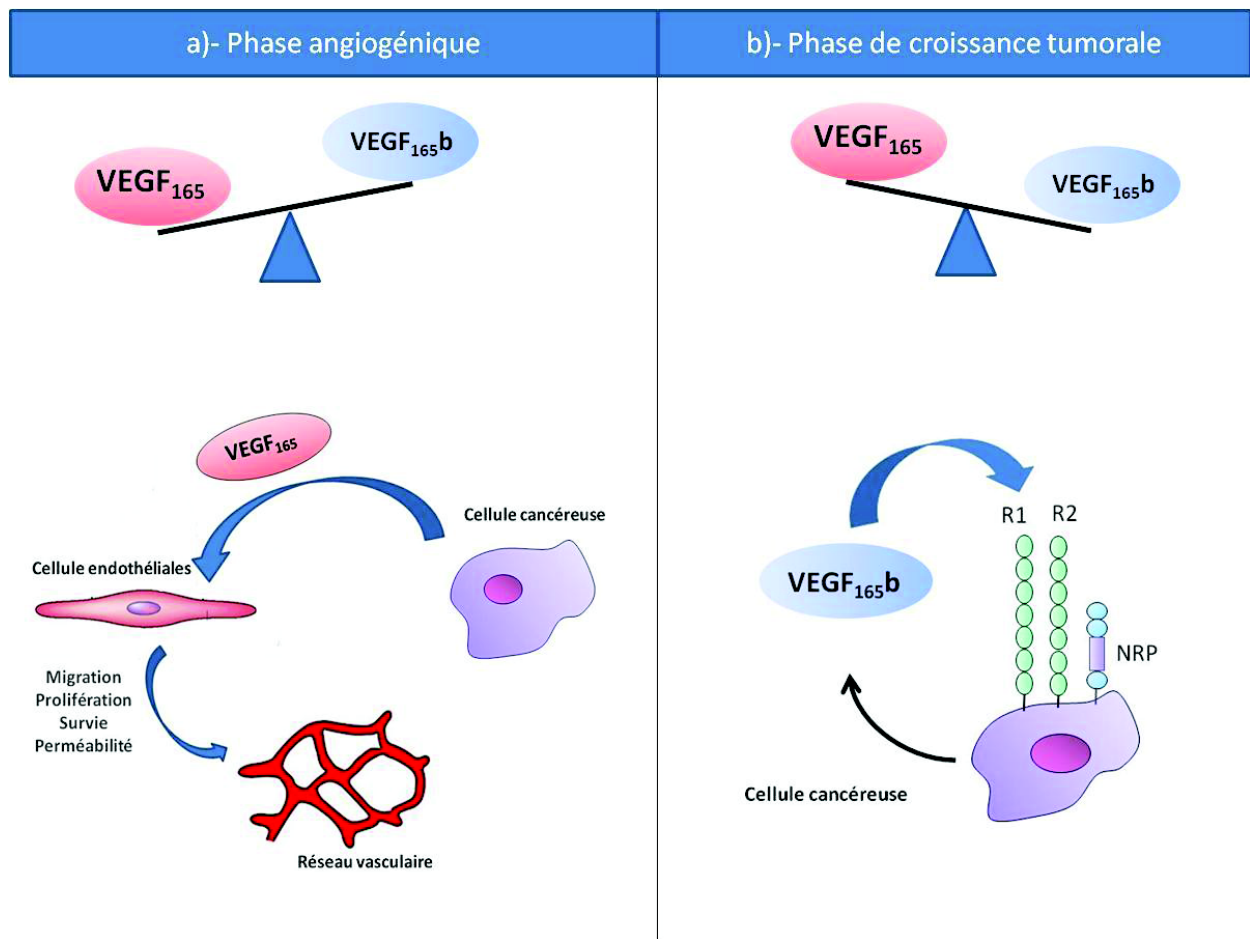


Figure 34. Rôle du « switch » entre les isoformes VEGF_{xxx} et $\text{VEGF}_{xxx}b$ au cours du développement tumoral. (a) Durant les premières phases de l'établissement de la tumeur, les cellules tumorales sécrètent de manière préférentielle les isoformes pro-angiogéniques VEGF_{xxx} . Ces isoformes jouent un rôle central dans le développement du réseau vasculaire et maintiennent les cellules tumorales dans un état de croissance ralentie en inhibant les voies de prolifération. Le VEGF_{165} entretient cette signalisation en favorisant son expression par la voie VEGFR2/mTOR . (b) La seconde phase consiste en la mise en place d'une signalisation autocrine contrôlée par l'isoforme VEGF_{165b} . Cette signalisation autocrine permet aux cellules tumorales de proliférer et donc à la tumeur de croître et de survivre sans étendre le réseau vasculaire pré-établi.

L'identification des facteurs moléculaires qui contrôlent ce « switch » est aussi une question très importante. Nous montrons que les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR, SRSF2 et SRSF6, favorisent l'expression du VEGF_{165b} dans nos modèles cellulaires. Nous avons aussi décrit que les facteurs d'épissage SRSF2 et SRSF6 étaient surexprimés dans les carcinomes pulmonaires (Gout et al., 2012 et données non publiées). Il serait donc intéressant de déterminer à quels stades des lésions préneoplasiques cette surexpression surviendrait-elle.

II. Isoformes VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b : des signalisations distinctes, des partenaires distincts

II.1. VEGF₁₆₅b : il signale dans les cellules tumorales dérivées de CBnPCs

Nos modèles cellulaires expriment les deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 et nos résultats montrent que le VEGF₁₆₅b est capable d'activer les deux. Nous pensons que cette activation concomitante est importante pour les activités du VEGF₁₆₅b que nous détectons en aval. Dans les tumeurs, nous n'avons pas pu, faute d'anticorps anti-phospho-VEGFR2 fonctionnant en IHC, détecter la forme phosphorylée du VEGFR2. A l'inverse, nous avons montré une accumulation de P-VEGFR1(Tyr1213) et corrélée cette accumulation au statut du VEGF₁₆₅b. Bien que dans les cellules endothéliales, le VEGFR2 soit le récepteur principal transduisant le signal, nous montrons donc une activation du VEGFR1 dans les cellules tumorales pulmonaires. De façon intéressante, une collaboration du VEGFR1 avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR et le corécepteur NRP1 a déjà été décrite dans d'autres types de tumeurs, où une boucle de signalisation autocrine VEGF/VEGFR/EGFR a été identifiée (Lichtenberger et al 2010). Dans la mesure où nos modèles cellulaires H358 et H1299 expriment un EGFR sauvage, il pourrait être intéressant de regarder l'activation de l'EGFR en réponse au VEGF₁₆₅b. Une autre question soulevée par nos résultats est pourquoi le VEGF₁₆₅b active les 2 récepteurs : agissent-ils de façon synergique ou coopèrent-ils pour médier telle ou telle signalisation en aval ou promouvoir l'un la prolifération cellulaire, l'autre la survie ? Dans les cellules endothéliales, il a été montré que le VEGFR1 pouvait stimuler la trans-phosphorylation du VEGFR2 (Autiero et al., 2003). De plus, une hétérodimérisation des récepteurs VEGFR1/VEGFR2 a été décrite (Cudmore et al., 2012). Pour l'instant, ces hétérodimères n'ont pas été observés dans les tumeurs. Nous nous sommes donc demandé si des complexes VEGFR1/VEGFR2 ne seraient pas impliqués dans les effets différentiels induits par le VEGF₁₆₅ et le VEGF₁₆₅b dans nos modèles. Bien que nos expériences de co-immunoprécipitation ne nous permettent pas de conclure, nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant qu'une hétérodimérisation entre le VEGFR1 et le VEGFR2 pourrait se produire dans les cellules de CBnPCs. De façon importante, ces deux récepteurs semblent capables de s'hétérodimériser de manière plus importante en réponse au VEGF₁₆₅b qu'en présence de VEGF₁₆₅. Les rôles respectifs de l'activation du VEGFR1 et du VEGFR2, ainsi que l'impact de tels dimères dans nos modèles cellulaires restent à déterminer. Des

expériences avec des inhibiteurs ou des ARN interférents spécifiques de chaque récepteur permettraient d'apporter quelques réponses quant aux fonctions exactes de chaque récepteur dans les tumeurs.

II.2. VEGF_{165b} : des partenaires distincts pour signaler plus longtemps

L'un des faits le plus marquants de notre étude est l'induction d'une signalisation prolongée dépendante des VEGFRs après traitement au VEGF_{165b}. Cette différence de signalisation entre les deux isoformes VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} pourrait être due à des variations de trafic intracellulaire puisque l'internalisation des VEGFR semble importante pour leur activation, et/ou à des variations dans l'association des récepteurs avec différents partenaires. En effet, il a été montré, dans les cellules endothéliales, que le trafic intracellulaire du VEGFR2 après activation par un ligand capable de se lier à la NRP1, comme le VEGF₁₆₅, passait par son internalisation dans les vésicules d'endocytose Rab4 et Rab5 (Ballmer-Hoffer et al., 2011). Le récepteur est ensuite déphosphorylé et son recyclage à la membrane plasmique est assuré par les vésicules Rab11. Cependant, dans le cas des isoformes ne liant pas la NRP1, comme le VEGF_{165b}, le VEGFR2 est internalisé dans les vésicules Rab4 et Rab5 mais ne subit pas de recyclage membranaire et est orienté vers la dégradation par le protéasome via les vésicules Rab7. Cela implique que la signalisation induite par le VEGFR2 présent dans les vésicules Rab7 ne s'achève que lorsque ce récepteur est dégradé. Ces résultats pourraient expliquer pourquoi le VEGF_{165b} signale moins efficacement et plus transitoirement que l'isoforme VEGF₁₆₅ dans les cellules endothéliales. Ces mécanismes identifiés dans les cellules endothéliales peuvent-ils être extrapolables aux cellules tumorales qui possèdent ce set de récepteurs ? Nous avons montré dans nos modèles cellulaires une accumulation des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sous forme phosphorylée 72 heures, voir même 6 jours après l'addition de rhVEGF_{165b}. Ces résultats suggèrent que le pool de VEGFR1 et/ou VEGFR2 activé demeure élevé longtemps dans les cellules tumorales traités par cette isoforme, et que d'autres voies de signalisation prennent sans doute le relais pour maintenir ces récepteurs sous forme phosphorylée. Cela semble être vrai aussi dans les CBnPCs puisque nous avons détecté l'accumulation de P-VEGFR1(Tyr1213) dans ces tumeurs. Nous n'avons pas étudié le trafic intra-cellulaire des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 en réponse au VEGF_{165b} dans nos

modèles cellulaires mais il serait peut-être important de le faire afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de cette phosphorylation.

Nous avons observé que le VEGF_{165b} maintient principalement la phosphorylation du VEGFR2 sur son résidu (Tyr1214) et conduit aussi à l'activation de la p38 MAPK. De façon intéressante, ce profil d'activation a été décrit dans les cellules endothéliales en réponse à un ligand VEGF₁₆₅ couplé à la matrice, et est marqué par la formation de complexes physiques entre l'intégrine $\beta 1$ et le VEGFR2 (Chen et al., 2010). Nous nous sommes donc demandé si une interaction VEGFRs/intégrine ne pourrait pas être à l'origine de ces phosphorylations prolongées. Des données récentes ont montré que l'intégrine $\beta 1$ était impliquée dans la signalisation dépendante des VEGFRs dans les cellules tumorales (Chen et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que dans les cellules de glioblastomes présentant une résistance au BVZ, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ était augmentée (Jahangiri et al., 2014). Nous avons essayé de co-immunoprécipiter des complexes VEGFR2/intégrine $\beta 1$, VEGFR2/NRP1 ou VEGFR2/NRP2 dans nos cellules en présence ou non de rhVEGF_{165b}. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à reproduire des résultats fiables. A l'inverse, nous avons observé une augmentation significative de l'expression protéique de l'intégrine $\beta 1$ et de la NRP2 suite au traitement par le VEGF_{165b} dans nos modèles cellulaires, et nous avons co-immunoprécipité des complexes intégrine $\beta 1$ /NRP2 dans les cellules traitées par le VEGF_{165b}. Parallèlement, en réponse au VEGF_{165b}, nous avons observé une activation plus importante de l'intégrine $\beta 1$ suggérant qu'elle aurait une fonction clé dans les effets précédemment décrits. De façon intéressante, des interactions intégrine $\beta 1$ /NRP2 ont été impliquées dans l'initiation des cancers mammaires (Goel et al., 2013). Dans les modèles cellulaires de CBnPCs, nos résultats montrent que l'activation de cette intégrine participe à la formation de fibres de stress d'actine. De la même façon, la NRP2 semble importante pour la formation de ces fibres, qui pourraient favoriser la migration des cellules tumorales. En plus de jouer un rôle dans la migration des cellules endothéliales (Reymond et al., 2012), l'intégrine $\beta 1$ exprimée par les cellules endothéliales permet de promouvoir le potentiel métastatique des cellules tumorales exprimant la NRP2 à leur surface, en leur permettant d'effectuer une extravasation (Cao et al., 2013). Combiné à ces études, nos résultats identifient donc une signalisation activée par le VEGF_{165b} mettant en jeu l'activation des VEGFR1 et VEGFR2, la formation de complexes intégrines $\beta 1$ /NRP2 et une modification de la polymérisation du cytosquelette d'actine dans les cellules de CBnPCs, l'ensemble de ces modifications étant susceptibles de médier un

phénotype plus invasif. De manière intéressante, l'intégrine $\beta 3$ semble aussi jouer un rôle dans la réponse au VEGF_{165b}. Cependant, sa neutralisation n'impacte que sur la formation des fibres de stress et non sur l'étalement des cellules en réponse au BVZ. Les deux intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ n'auraient donc pas les mêmes fonctions dans notre système.

Nous n'avons pas encore déterminé avec exactitude la manière avec laquelle les VEGFRs communiquent avec la signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$, mais nous savons que dans ce processus, les NRPs et notamment la NRP2, agissent en formant des complexes physiques avec cette intégrine. En plus, d'activer directement les VEGFRs en se liant à eux, les intégrines peuvent aussi séquestrer les NRPs, et donc entrer en compétition avec les VEGFRs et réguler ainsi leur signalisation. Elles peuvent aussi activer des voies parallèles qui coopèrent avec les voies activées par les VEGFRs. A ce stade de nos résultats, nous pourrions donc proposer quatre mécanismes par lesquels le VEGF_{165b} pourrait agir sur la signalisation VEGFR2 et/ou intégrine $\beta 1$ (Figure 35). La première possibilité serait que l'activation par le VEGF_{165b} de la signalisation dépendante du VEGFR2 induise une activation dite « inside-out » de l'intégrine $\beta 1$ associée à la neuropiline 2. Une deuxième hypothèse serait que l'intégrine $\beta 1$ s'associe au VEGFR2 et que la liaison du VEGF_{165b} induise l'activation de l'ensemble du complexe. Une autre possibilité serait que, sans forcément former de complexe ternaire avec une NRP et le VEGFR2, le VEGF_{165b} active le VEGFR2 qui s'associerait à une NRP, et que l'activation du récepteur induirait une activation « inside-out » de l'intégrine $\beta 1$. Enfin, des cas d'activation directe de l'intégrine $\beta 1$ suite la liaison du VEGF-A ont été décrits.

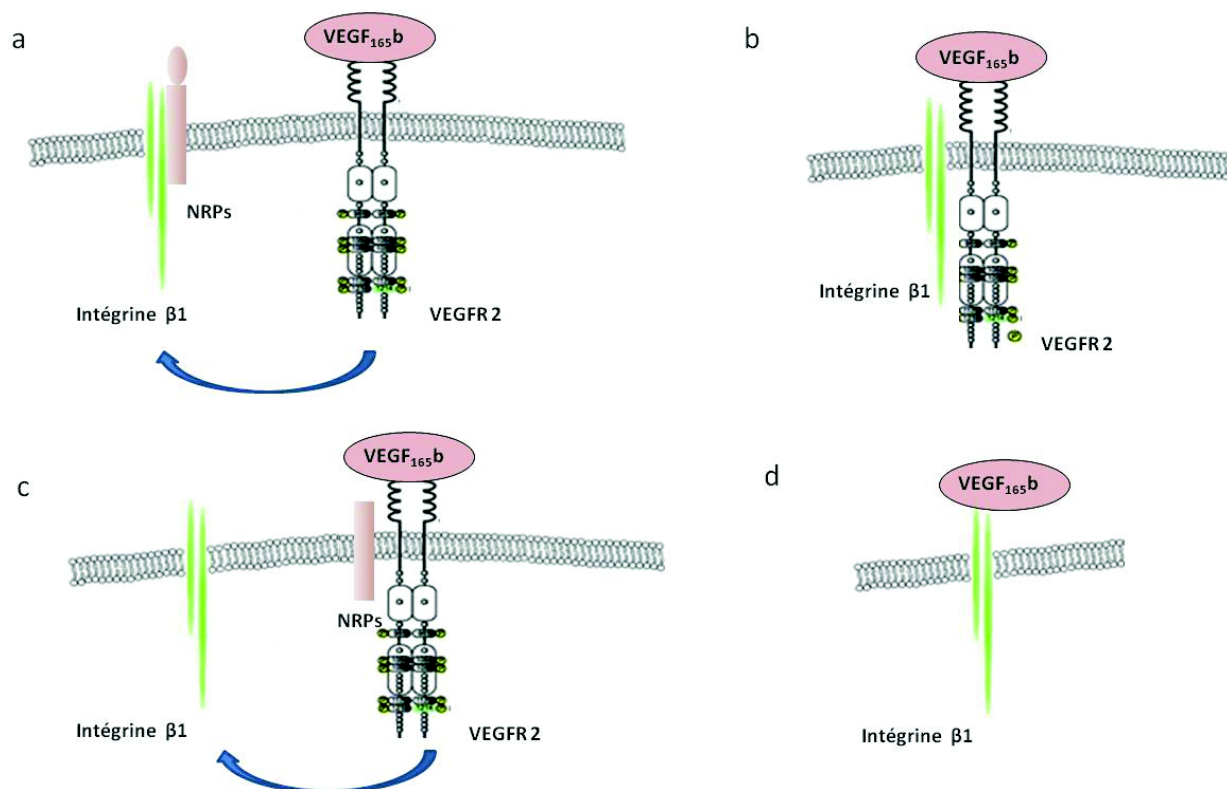


Figure 35. Mécanismes d'activation potentiels de l'intégrine $\beta 1$ suite à la liaison du VEGF_{165b} . (a) activation « inside-out » de l'intégrine $\beta 1$ par le complexe $\text{VEGF}_{165b}/\text{VEGFR2}$, (b) activation du complexe intégrine $\beta 1/\text{VEGFR2}$ par le VEGF_{165b} . (c) activation de l'intégrine $\beta 1$ par le complexe $\text{VEGFR2}/\text{NRP}$ après liaison du VEGF_{165b} au VEGFR2 , ces interactions n'impliquent pas la formation de complexes ternaires ligand/ VEGFR/NRP . (d) activation directe de l'intégrine $\beta 1$ suite à la liaison du VEGF_{165b} . Cette capacité à lier directement le VEGF-A n'a pour l'instant été observée que pour l'intégrine $\alpha_9\beta 1$. Ce modèle est présenté pour le VEGFR2 mais pourrait aussi s'appliquer au VEGFR1 .

Dans notre modèle, il est aussi possible qu'une signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$ agisse en retour sur la signalisation des VEGFRs . Une telle hypothèse repose sur certains de nos résultats montrant que la neutralisation de l'intégrine $\beta 1$ par ARN interférence induit une augmentation considérable de la phosphorylation du $\text{VEGFR1}(\text{Tyr1213})$. Cela implique qu'en absence de ligand, l'intégrine $\beta 1$ aurait un effet inhibiteur sur le VEGFR1 . L'une des hypothèses qui permettrait d'expliquer cet effet serait qu'en présence d'intégrine $\beta 1$ et en absence de ligand, les NRPs 1 et 2 se retrouvent séquestrées par celle-ci et donc incapable d'interagir avec le VEGFR1 . La neutralisation de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par un ARN interférent spécifique permettrait la libération de ces NRPs et leur interaction avec le VEGFR1 .

A ce stade de nos travaux, nos résultats suggèrent que les NRPs jouent un rôle important dans nos modèles cellulaires. Ces résultats « *in vitro* » sont confortés par nos résultats « *in situ* » dans les tumeurs puisque nous avons retrouvé une corrélation entre l'expression du VEGF_{165b} et l'expression de la NRP1, mais plus significativement de la NRP2. De manière surprenante, nous révélons une fonction compensatoire entre les deux NRPs, de telle sorte que lorsque l'expression de l'une est altérée, l'expression de l'autre est augmentée. Cet effet redondant de la neutralisation des NRP1 ou 2 pourrait remettre en question l'utilisation d'agent ciblant les NRPs dans le traitement de CBnPCs. Cette question est de première importance d'autant, qu'à l'heure actuelle, des essais de phase I/II sont en cours pour tester l'effet d'un anticorps anti-NRP1 couplés ou non au paclitaxel et au BVZ. Il est fort probable que l'inhibition de la signalisation induite par les NRPs puisse avoir des conséquences différentes de celles observées après l'inhibition de leur expression. Des expériences doivent être initiées dans ce sens, car si une redondance de fonction est observée dans ce contexte, cela rendrait les traitements anti-NRPs inutiles dans le cadre des traitements de CBnPCs.

III. Boucle autocrine dépendante des VEGF_{xxx}b dans les CBnPCs : un rôle dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques

Nos résultats montrent que le BVZ est capable d'activer une boucle autocrine de signalisation dépendante du VEGF_{165b} en affectant l'équilibre initial des isoformes et en faisant basculer le ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total} en faveur de l'isoforme VEGF_{165b}. Le BVZ ne pouvant pas pénétrer dans les cellules, les mécanismes par lesquels il exerce ses effets sur les cellules tumorales ne sont toujours pas clarifiés. Dans nos modèles cellulaires, nous avons montré que le BVZ capte environ 70% du VEGF-A sécrété dans le surnageant. Dans la mesure où il a été montré que le VEGF-A était capable de réguler sa propre traduction (Chatterjee et al., 2013), ces résultats amènent à se demander si le VEGF-A pourrait aussi contrôler son épissage alternatif. La liaison du BVZ au VEGF-A pourrait modifier la signalisation intra-cellulaire à l'origine de cet épissage différentiel. Bien que nous n'ayons jamais regardé l'effet que pourraient exercer les ligands VEGF₁₆₅ et VEGF_{165b} sur l'expression des protéines SR, nos résultats préliminaires montrent qu'en réponse au BVZ mais aussi au SU5416, l'expression de certaines protéines SR est augmentée, notamment celles impliquées dans la génération des isoformes VEGF_{xxx}b

comme SRSF2 ou SRSF6. A l'inverse, l'expression de SRSF1 impliquée dans la génération des isoformes pro-angiogéniques ne semble pas varier. Ces résultats suggèrent que le BVZ est capable d'activer une signalisation intra-cellulaire dans les CBnPCs qui modifie le statut de certains facteurs d'épissage. De façon importante, nous montrons aussi que les sels de platine utilisés seuls ou en association sont capables d'augmenter l'expression de l'isoforme VEGF_{165b}. Il serait donc intéressant d'analyser dans nos modèles cellulaires l'impact de ces combinaisons de traitement sur l'expression et/ou l'activation des VEGFR, NRP et/ou intégrine β 1.

Nous montrons «*in vitro*» que le BVZ stimule la prolifération cellulaire, conduit à la sécrétion de métalloprotéases et à la sécrétion de cytokines, ainsi qu'entraîne un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse dans nos modèles cellulaires. Les effets du BVZ sur les cellules tumorales «*in vitro*» restent controversés. Une étude récente sur différentes lignées cellulaires tumorales, incluant des CBnPCs, n'a pas montré d'effet du BVZ sur la prolifération de ces cellules après 72 heures de traitement (Hein and Graver, 2013). A l'inverse, une autre étude a montré que l'exposition prolongée (3 mois) de cellules de cancer colorectal au BVZ entraînait l'activation du VEGFR1 et un phénotype plus migratoire (Fan et al., 2011). Cependant, dans ces 2 études, les concentrations de BVZ utilisées étaient de 250 μ g/ml alors que nous montrons que dès 0.5 μ g/ml la quantité de VEGF-A total captée est maximale. Au cours de nos expériences «*in vitro*», nous avons travaillé à des doses de BVZ comprises entre 0,5 et 50 μ g/ml et à des temps de traitement élevés. A la dose la plus élevée (50 μ g/ml), nous avons parfois observé un effet en cloche sur l'expression des différents acteurs de la voie VEGF_{165b}/VEGFR. De plus, dans nos modèles cellulaires, nous n'avons observé l'augmentation du VEGF_{165b} en réponse au BVZ qu'à partir de 72h de traitement. Cela semble indiquer que les cellules ont besoin d'un temps d'adaptation assez long pour mettre en place les mécanismes à la base du changement du ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total}. Cela implique que la réponse des cellules tumorales au BVZ, «*in vitro*», pourrait dépendre de plusieurs facteurs comme le type cellulaire, les doses utilisées et les temps de traitement.

De manière intéressante, dans une seconde phase de nos travaux, nous avons constaté que le BVZ induisait la formation de fibres de stress d'actine dans nos modèles de CBnPCs. A notre connaissance, c'est la première fois que ce type de phénotype est décrit en réponse au BVZ. Nous attribuons cet effet à l'augmentation du VEGF_{165b} en réponse au BVZ, puisqu'un profil

similaire est observé lorsque ces cellules sont traitées au rhVEGF_{165b} et que la neutralisation du VEGF_{165b} par ARN interférence reverse ce phénotype dans les cellules traitées au BVZ. Nous montrons aussi que le BVZ augmente l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et des études sont actuellement en cours pour rechercher si cette intégrine est activée. De façon importante, une accumulation de l'intégrine $\beta 1$ a récemment été impliquée dans la résistance des patients au BVZ dans les glioblastomes (Carbonell et al., 2013). Nos résultats étendent donc à un autre type tumoral l'implication de l'intégrine $\beta 1$ dans la réponse au BVZ. Dans les glioblastomes, non seulement, l'inhibition de l'activité de cette intégrine potentialise l'effet des thérapies anti-angiogéniques mais elle réduit le potentiel invasif des tumeurs induit par le BVZ (Ishida et al., 2014). Nous montrons qu'une approche similaire pourrait être tout à fait pertinente dans les CBnPCs où nous observons que la combinaison du BVZ avec les chimiothérapies pourrait rendre les cellules résistantes à ces dernières.

Un modèle de réponse au BVZ mettant en jeu différentes isoformes du VEGF-A a été récemment proposé (Lambrechts et al., 2013). Ce modèle est basé sur l'expression des isoformes solubles et des isoformes moins solubles qui agissent au niveau de différents sites (foyer tumoral ou action à distance de ce foyer sur les vaisseaux), pour permettre le développement tumoral en favorisant la mise en place d'un réseau vasculaire stable. Dans ce modèle, une expression élevée de l'isoforme VEGF₁₂₁ la plus diffusible, et à l'inverse une expression faible des isoformes moins diffusibles VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉ favoriseraient un profil angiogénique des tumeurs qui seraient donc plus sensibles au BVZ. Le rôle du VEGF_{165b} dans ce cas là est celui d'une isoforme à activité anti-angiogénique dont de hauts niveaux d'expression seraient associés à une moins bonne réponse au BVZ (Bates et al., 2012). Bien que ce modèle semble largement dépendant du type tumoral, nous proposons que la réponse des CBnPCs au BVZ pourrait aussi dépendre d'une signalisation autocrine contrôlée par le VEGF_{165b} (figure 36). La croissance des ces tumeurs ne dépendrait plus de l'extension de leur réseau vasculaire, ce qui indiquerait que les tumeurs exprimant de hauts niveaux de cette isoforme seraient réfractaires au traitement par BVZ. Parallèlement, nous avons montré que les traitements anti-angiogéniques augmentaient l'expression de cette isoforme, ce qui à terme rendrait des tumeurs, au départ sensibles, résistantes à ces traitement. Jusqu'à présent, nous n'avons pas eu l'occasion de travailler sur des échantillons de patients ayant été traités pour valider ce modèle « *in situ* ». Nous venons d'avoir récemment accès à une quinzaine d'échantillons de sérum issus de patients pour lesquels on connaît la réponse et

prélevés avant et après traitement au BVZ combiné aux chimiothérapies. Bien que la pertinence du dosage sérique du VEGF-A demeure controversée en raison de son relargage par les plaquettes, il a été montré que les taux de VEGF-A plasmatiques n'étaient pas associés aux niveaux retrouvés dans les tumeurs, alors que les taux de VEGF-A sériques le sont au moins dans les carcinomes hépatocellulaires (Hegde et al., 2013). De plus, le taux sérique de VEGF_{165b} ne semble pas corrélé au taux de plaquettes dans le sérum de patients atteints de CBnPC, il en est de même pour le VEGF_{total} (Kim et al., 2013). Nous allons initier le dosage par ELISA du VEGF-A total, du VEGF₁₆₅ et du VEGF_{165b} dans ces sérums de patients avant/après traitement. Le but de ces expériences sera d'évaluer l'impact de ces thérapies sur la sécrétion des différents isoformes du VEGF-A et de regarder, par la suite, l'existence d'une corrélation éventuelle avec la réponse des patients.

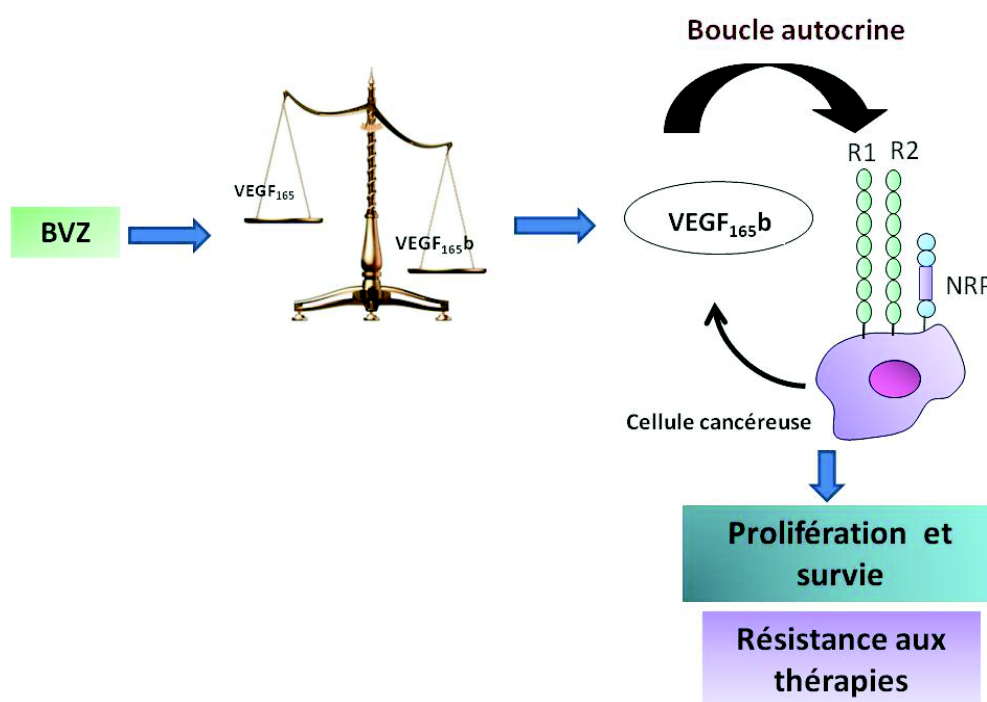


Figure 36. Promotion de la signalisation autocrine dépendante du VEGF_{165b} dans les CBnPCs par le BVZ. Le traitement par BVZ augmente le ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total} par un mécanisme qui pourrait impliquer une modification de l'expression de certaines protéines SR. Le VEGF_{165b} induit une signalisation autocrine dépendante des VEGFRs afin de promouvoir la prolifération, la survie et la résistance aux thérapies anti-angiogéniques et chimiothérapies.

IV. Le VEGF_{165b} : un acteur de l'adaptation cellulaire en réponse aux thérapies anti-angiogéniques

Il a été montré dans de nombreux modèles tumoraux que les résistances aux thérapies anti-angiogéniques découlent aussi d'une adaptation des cellules à un environnement devenu hostile, souvent hypoxique, et reposent sur la mise en place par les tumeurs de mécanismes compensatoires leur permettant de survivre même en absence d'une signalisation VEGF/VEGFRs dépendante. Nous avons montré qu'une modulation de l'expression du VEGF_{165b} dans les cellules de CBnPCs pouvait modifier leur résistance à l'hypoxie tout du moins « *in vitro* ». Ces résultats suggèrent que l'augmentation de cette isoforme en réponse au BVZ pourrait contribuer à l'échappement des tumeurs à l'hypoxie. On ne sait pas à l'heure actuelle si HIF-1 pourrait être impliqué dans la régulation du VEGF_{165b} et/ou plus largement dans l'épissage du *VEGF-A*, mais nous avons observé qu'en réponse à l'hypoxie l'expression de la protéine SR, SRSF6 augmente dans nos modèles cellulaires. Combinées à l'effet du VEGF_{165b} sur la résistance à l'apoptose induite par les sels de platine, nos données « *in vitro* » suggèrent que l'isoforme VEGF_{165b} pourrait aussi participer à l'adaptation des tumeurs à l'environnement hostile généré par les thérapies anti-angiogéniques utilisées seules ou en combinaison avec les chimiothérapies.

V. La signalisation autocrine dépendante des isoformes du VEGF-A : rôle potentiel dans la résistance à d'autres thérapies ciblées.

La surexpression ou l'activation constitutive de l'EGFR survient fréquemment dans les tumeurs humaines. Cette hyperactivation de l'EGFR résulte en une augmentation de la prolifération, de la survie et de la capacité de dissémination des cellules tumorales (Hynes et MacDonald, 2009). Ces effets induits par l'EGFR dans les cellules tumorales ont fait de ce récepteur une cible de choix dans le développement de thérapies ciblées. De ce fait, deux approches principales ont été adoptées. L'une consiste à bloquer le site de liaison du ligand au récepteur, principalement en utilisant des anticorps monoclonaux, on retrouvera dans cette catégorie des agents comme cetuximab et panitumumab. L'autre catégorie d'agents ciblant l'EGFR est représentée par de petites molécules à activité inhibitrice de tyrosine kinase (TKI). On y trouve notamment des molécules telles que gefitinib ou le lapatinib qui fixent le

domaine intra-cellulaire de l'EGFR et inhibent son activation. Les anticorps anti-EGFR sont spécifiques à leur cible contrairement aux EGFR TKIs, qui eux, inhibent aussi l'activité d'autres récepteurs. Cette propriété des TKI est d'autant plus intéressante qu'elle n'inhibe pas seulement l'activation des homodimères d'EGFR mais aussi l'activité d'hétérodimères entre l'EGFR et d'autres membres de la famille HER à laquelle appartient ce récepteur.

De façon intéressante, des « cross-talks » entre les voies EGFR et VEGFR ont été identifiés. Ainsi, les cellules tumorales traitées à l'heréguline, ligand des récepteurs HER3/HER4, présentent une augmentation de l'expression du VEGF-A (Kumar et Yarmand-Bagheri, 2001). Les EGFR TKIs tels que gefitinib et erlotinib, diminuent aussi l'expression du VEGF-A (Ciardiello et al., 2001 ; Pore et al., 2006). Le fait que l'activité d'EGFR puisse impacter sur celle du VEGF-A, et vice et versa, fait de l'inhibition concomitante de ces deux signalisations une piste des plus intéressantes dans la recherche de thérapies anti-cancer. Des agents anti-EGFR/VEGFR ont donc été développés. Parmi ces agents multi-cibles, on retrouve le vandetanib qui a pour cible EGFR et VEGFR2 (Wedge et al., 2002) et le AEE788 qui cible l'EGFR, HER2, VEGFR1 et VEGFR2. Dans ce contexte, une fonction surprenante des hétérodimères d'EGFR a été décrite. En effet, les anticorps ciblant EGFR ou HER2 induisent une diminution de l'expression du VEGF-A (Petit et al., 1997). Les premières études précliniques qui se sont intéressées à la combinaison des thérapies ciblant la voie VEGF/VEGFR et celles ciblant l'EGFR ont montré des résultats encourageants (Ciardiello et al., 2000 ; Shaheen et al., 2001). Les résultats d'une étude menée sur des xénogreffes de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires suggèrent que le blocage combiné des voies EGFR et VEGFR peut abroger la résistance primaire ou acquise aux EGFR TKIs (Naumov et al., 2009). Cette approche n'a pas été testée chez les patients atteints de CBNPCs. Il est important de noter que la combinaison des anticorps ciblant l'EGFR et le VEGFR a été introduite en clinique sans passer par des tests précliniques (Punt et al., 2009). L'étude BOND2, consistant en des essais randomisés chez des patients atteints de cancers colorectaux en stades avancés, a montré des résultats prometteurs de la combinaison BVZ/cetuximab comparée au cetuximab seul (Saltz et al., 2007). Cependant, les résultats de l'étude CAIRO2 effectuée sur 1800 patients, et étudiant la même combinaison BVZ/cetuximab, ont été très décevants avec une survie sans progression inférieure lorsque les patients sont traités avec la combinaison BVZ/cetuximab additionnée de chimiothérapies en comparaison avec un traitement BVZ/chimiothérapie (Tol et al., 2009).

De la même façon l'hypothèse selon laquelle l'expression du VEGF-A serait capable d'affecter la réponse aux thérapies anti-EGFR est soutenue par les résultats *in vivo* et *in vitro* dans divers types tumoraux. Il a été montré que les cellules surexprimant le VEGF-A étaient résistantes aux anticorps ciblant l'EGFR *in vivo* (Violoria-Petit et al., 2001). Ces mêmes résultats sont retrouvés dans les tumeurs du colon et de la prostate possédant une résistance acquise au gefitinib ou au cetuximab et qui démontrent des niveaux plus élevés de VEGF-A (Bianco et al., 2008). De plus, des modèles de xénogreffes de CBnPCs ayant des résistances acquises à l'erlotinib démontrent des niveaux de VEGF-A plus élevés (Naumov et al., 2009). Ces études, bien que suggérant une implication du VEGF-A dans la résistance aux EGFR TKI, ne se sont pas intéressées aux variations des différents isoformes du VEGF-A. Il serait intéressant de rechercher les variations des niveaux des variants du VEGF-A dans ces mêmes modèles. Il faut noter que nos expériences n'ont montré aucune variation dans les niveaux d'expression et/ou de phosphorylation de l'EGFR suite au traitement par BVZ dans nos lignées d'adénocarcinomes pulmonaires présentant un EGFR sauvage. Il serait intéressant de le confirmer en utilisant un VEGFR TKI sur les mêmes lignées. Il serait aussi intéressant de tester l'effet du BVZ et/ou d'un VEGFR TKI sur des lignées présentant un EGFR muté. De manière intéressante, il semblerait que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ puissent aussi jouer un rôle dans la résistance aux thérapies ciblant EGFR. En effet, une étude récente a démontré que l'intégrine $\beta 1$ serait impliquée dans la résistance aux EGFR TKIs via la promotion de l'EMT (Ju et Zhou, 2013). D'autre part, il a été montré qu'une activation de Src à travers l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ augmente la résistance aux anti-IGF1R dans les cellules de CBnPCs (Shin et al., 2013). Cette étude suggère que la combinaison d'agents ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ avec des anti-IGF1R pourrait rendre les cellules plus sensibles aux anti-IGF1R. Dans le contexte de ces études, il serait intéressant de rechercher une possible implication de la voie VEGF/VEGFR dans les résistances liées à une surexpression des intégrines $\beta 1$ ou $\beta 3$.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Aase, K., von Euler, G., Li, X., Pontén, A., Thorén, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., Alitalo, K., Betsholtz, C., Eriksson, U., 2001. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104, 358–364.
- Abdollahi, A., Hahnfeldt, P., Maercker, C., Gröne, H.-J., Debus, J., Ansorge, W., Folkman, J., Hlatky, L., Huber, P.E., 2004. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol. Cell* 13, 649–663.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., Levi, B.Z., 1998. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 17, 227–236. doi:10.1038/sj.onc.1202019
- Albuquerque, R.J.C., Hayashi, T., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Dridi, S., Takeda, A., Baffi, J.Z., Yamada, K., Kaneko, H., Green, M.G., Chappell, J., Wilting, J., Weich, H.A., Yamagami, S., Amano, S., Mizuki, N., Alexander, J.S., Peterson, M.L., Brekken, R.A., Hirashima, M., Capoor, S., Usui, T., Ambati, B.K., Ambati, J., 2009. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med.* 15, 1023–1030. doi:10.1038/nm.2018
- Alevizakos, M., Kaltsas, S., Syrigos, K.N., 2013. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72, 1169–1181. doi:10.1007/s00280-013-2298-3
- Allegra, C.J., Yothers, G., O'Connell, M.J., Sharif, S., Petrelli, N.J., Lopa, S.H., Wolmark, N., 2013. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 359–364. doi:10.1200/JCO.2012.44.4711
- Ambati, B.K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P.D., Suthar, T., Albuquerque, R.J.C., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M.T., Kleinman, M.E., Caldwell, R.B., Lin, Q., Ogura, Y., Orecchia, A., Samuelson, D.A., Agnew, D.W., St. Leger, J., Green, W.R., Mahasreshti, P.J., Curiel, D.T., Kwan, D., Marsh, H., Ikeda, S., Leiper, L.J., Collinson, J.M., Bogdanovich, S., Khurana, T.S., Shibuya, M., Baldwin, M.E., Ferrara, N., Gerber, H.-P., De Falco, S., Witt, J., Baffi, J.Z., Raisler, B.J., Ambati, J., 2006. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443, 993–997. doi:10.1038/nature05249
- Amin, E.M., Oltean, S., Hua, J., Gammons, M.V.R., Hamdollah-Zadeh, M., Welsh, G.I., Cheung, M.-K., Ni, L., Kase, S., Rennel, E.S., Symonds, K.E., Nowak, D.G., Royer-Pokora, B., Saleem, M.A., Hagiwara, M., Schumacher, V.A., Harper, S.J., Hinton, D.R., Bates, D.O., Ladomery, M.R., 2011. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20, 768–780. doi:10.1016/j.ccr.2011.10.016
- Ancelin, M., Buteau-Lozano, H., Meduri, G., Osborne-Pellegrin, M., Sordello, S., Plouët, J., Perrot-Appianat, M., 2002. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6023–6028. doi:10.1073/pnas.082110999
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.-M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M., 2004. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279, 38458–38465. doi:10.1074/jbc.M406026200

- Arcondéguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H., Touriol, C., 2013. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 41, 7997–8010. doi:10.1093/nar/gkt539
- Artac, R.A., McFee, R.M., Smith, R.A.L., Baltes-Breitwisch, M.M., Clopton, D.T., Cupp, A.S., 2009. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. *Biol. Reprod.* 81, 978–988. doi:10.1095/biolreprod.109.078097
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S., Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U., Dewerschin, M., Dombrowski, S., Stanimirovic, D., Van Hummelen, P., Dehio, C., Hicklin, D.J., Persico, G., Herbert, J.-M., Communi, D., Shibuya, M., Collen, D., Conway, E.M., Carmeliet, P., 2003. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 9, 936–943. doi:10.1038/nm884

B

- Bachelder, R.E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M.A., Shaw, L.M., Robinson, G., Mercurio, A.M., 2001. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 61, 5736–5740.
- Bachelder, R.E., Lipscomb, E.A., Lin, X., Wendt, M.A., Chadborn, N.H., Eickholt, B.J., Mercurio, A.M., 2003. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res.* 63, 5230–5233.
- Bagci, T., Wu, J.K., Pfannl, R., Ilag, L.L., Jay, D.G., 2009. Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* 28, 3537–3550. doi:10.1038/onc.2009.204
- Bagri, A., Berry, L., Gunter, B., Singh, M., Kasman, I., Damico, L.A., Xiang, H., Schmidt, M., Fuh, G., Hollister, B., Rosen, O., Plowman, G.D., 2010. Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 3887–3900. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3100
- Baldwin, M.E., Halford, M.M., Roufail, S., Williams, R.A., Hibbs, M.L., Grail, D., Kubo, H., Stacker, S.A., Achen, M.G., 2005. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2441–2449. doi:10.1128/MCB.25.6.2441-2449.2005
- Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, C.A., Kielty, C.M., 2010. Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J.* 427, 29–40. doi:10.1042/BJ20091512
- Ballmer-Hofer, K., Andersson, A.E., Ratcliffe, L.E., Berger, P., 2011. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 118, 816–826. doi:10.1182/blood-2011-01-328773
- Barlesi, F., Scherpereel, A., Rittmeyer, A., Pazzola, A., Ferrer Tur, N., Kim, J.-H., Ahn, M.-J., Aerts, J.G.J.V., Gorbunova, V., Vikström, A., Wong, E.K., Perez-Moreno, P., Mitchell, L., Groen, H.J.M., 2013. Randomized phase III trial of maintenance bevacizumab with or without pemetrexed after first-line induction with bevacizumab, cisplatin, and pemetrexed in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAPERL (MO22089). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3004–3011. doi:10.1200/JCO.2012.42.3749
- Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.-T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.-J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M.M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D.N., Ivy, P., Scadden, D.T., Benner, T., Loeffler, J.S., Wen, P.Y., Jain, R.K., 2007. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and

- alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11, 83–95.
doi:10.1016/j.ccr.2006.11.021
- Bates, D.O., Catalano, P.J., Symonds, K.E., Varey, A.H.R., Ramani, P., O'Dwyer, P.J., Giantonio, B.J., Meropol, N.J., Benson, A.B., Harper, S.J., 2012. Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 6384–6391.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2223
- Bates, D.O., Cui, T.-G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., Harper, S.J., 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 4123–4131.
- Bates, D.O., MacMillan, P.P., Manjaly, J.G., Qiu, Y., Hudson, S.J., Bevan, H.S., Hunter, A.J., Soothill, P.W., Read, M., Donaldson, L.F., Harper, S.J., 2006. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx_b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 110, 575–585.
doi:10.1042/CS20050292
- Bates, D.O., Mavrou, A., Qiu, Y., Carter, J.G., Hamdollah-Zadeh, M., Barratt, S., Gammons, M.V., Millar, A.B., Salmon, A.H.J., Oltean, S., Harper, S.J., 2013. Detection of VEGF-A(xxx)_b isoforms in human tissues. *PloS One* 8, e68399. doi:10.1371/journal.pone.0068399
- Beasley, M.B., Brambilla, E., Travis, W.D., 2005. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin. Roentgenol.* 40, 90–97.
- Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K.K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P.A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A., Mascré, G., Drogat, B., Dekoninck, S., Haigh, J.J., Carmeliet, P., Blanpain, C., 2011. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 478, 399–403. doi:10.1038/nature10525
- Becker, P.M., Waltenberger, J., Yachechko, R., Mirzapoiazova, T., Sham, J.S.K., Lee, C.G., Elias, J.A., Verin, A.D., 2005. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ. Res.* 96, 1257–1265.
doi:10.1161/01.RES.0000171756.13554.49
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410. doi:10.1038/nrc1093
- Bergers, G., Hanahan, D., 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603. doi:10.1038/nrc2442
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., Hanahan, D., 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 111, 1287–1295. doi:10.1172/JCI17929
- Berggreen, E., Wiig, H., 2014. Lymphatic function and responses in periodontal disease. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2013.12.006
- Bianco R, Garofalo S, Rosa R, Damiano V, Gelardi T, Daniele G, Marciano R, Ciardiello F, Tortora G. Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. 2008. *Br J Cancer.* 98(5):923-30. doi: 10.1038/sj.bjc.6604269.
- Bigler, S.A., Deering, R.E., Brawer, M.K., 1993. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol.* 24, 220–226.
- Blagoev, K.B., Wilkerson, J., Stein, W.D., Motzer, R.J., Bates, S.E., Fojo, A.T., 2013. Sunitinib does not accelerate tumor growth in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cell Rep.* 3, 277–281. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.015
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M.S., 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404–407. doi:10.1038/37126
- Botelho, F., Pina, F., Lunet, N., 2010. VEGF and prostatic cancer: a systematic review. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 19, 385–392. doi:10.1097/CEJ.0b013e32833b48e1
- Bumbaca, D., Xiang, H., Boswell, C.A., Port, R.E., Stainton, S.L., Mundo, E.E., Ulufatu, S., Bagri, A., Theil, F.-P., Fielder, P.J., Khawli, L.A., Shen, B.-Q., 2012. Maximizing tumour exposure to anti-neuropilin-1 antibody requires saturation of non-tumour tissue antigenic sinks in mice. *Br. J. Pharmacol.* 166, 368–377. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01777.x

Brüske-Hohlfeld I., 2009. Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods Mol Biol.* 472:3-23.

- Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., Boente, M., Birrer, M.J., Liang, S.X., Gynecologic Oncology Group, 2011. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 365, 2473–2483. doi:10.1056/NEJMoa1104390
- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., Perrot-Appanat, M., 2002. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res.* 62, 4977–4984.
- Byzova, T.V., Goldman, C.K., Pampori, N., Thomas, K.A., Bett, A., Shattil, S.J., Plow, E.F., 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell* 6, 851–860.

C

- Cackowski, F.C., Xu, L., Hu, B., Cheng, S.-Y., 2004. Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84, 82–94. doi:10.1016/j.ygeno.2004.02.001
- Cameron, D., Brown, J., Dent, R., Jackisch, C., Mackey, J., Pivot, X., Steger, G.G., Suter, T.M., Toi, M., Parmar, M., Laeufle, R., Im, Y.-H., Romieu, G., Harvey, V., Lipatov, O., Pienkowski, T., Cottu, P., Chan, A., Im, S.-A., Hall, P.S., Bubuteishvili-Pacaud, L., Henschel, V., Deurloo, R.J., Pallaud, C., Bell, R., 2013. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 933–942. doi:10.1016/S1470-2045(13)70335-8
- Cao, Q., Ju, X., Li, P., Meng, X., Shao, P., Cai, H., Wang, M., Zhang, Z., Qin, C., Yin, C., 2012. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk. *PloS One* 7, e50302. doi:10.1371/journal.pone.0050302
- Cao, Y., Hoepfner, L.H., Bach, S., E, G., Guo, Y., Wang, E., Wu, J., Cowley, M.J., Chang, D.K., Waddell, N., Grimmond, S.M., Biankin, A.V., Daly, R.J., Zhang, X., Mukhopadhyay, D., 2013. Neuropilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial $\alpha 5$ integrin. *Cancer Res.* 73, 4579–4590. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0529
- Cao, Y., Wang, L., Nandy, D., Zhang, Y., Basu, A., Radisky, D., Mukhopadhyay, D., 2008. Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. *Cancer Res.* 68, 8667–8672. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2614
- Carbone, M., Yang, H., 2012. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 598–604. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2259
- Carbonell, W.S., DeLay, M., Jahangiri, A., Park, C.C., Aghi, M.K., 2013. $\beta 1$ integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* 73, 3145–3154. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0011
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936. doi:10.1038/nature04478
- Carmeliet, P., Collen, D., 1999. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237, 133–158.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439. doi:10.1038/380435a0

- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427. doi:10.1038/nrd3455
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., Hanahan, D., 2005. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005
- Cascone, T., Herynk, M.H., Xu, L., Du, Z., Kadara, H., Nilsson, M.B., Oborn, C.J., Park, Y.-Y., Erez, B., Jacoby, J.J., Lee, J.-S., Lin, H.Y., Ciardiello, F., Herbst, R.S., Langley, R.R., Heymach, J.V., 2011. Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.* 121, 1313–1328. doi:10.1172/JCI42405
- Castro-Rivera, E., Ran, S., Thorpe, P., Minna, J.D., 2004. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF₁₆₅ antagonizes this effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11432–11437. doi:10.1073/pnas.0403969101
- Catena, R., Larzabal, L., Larrayoz, M., Molina, E., Hermida, J., Agorreta, J., Montes, R., Pio, R., Montuenga, L.M., Calvo, A., 2010. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol. Cancer* 9, 320. doi:10.1186/1476-4598-9-320
- Caunt, M., Mak, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R.K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H.B., Ross, J., Berry, L., Kasman, I., Zlot, C., Cheng, Z., Le Couter, J., Filvaroff, E.H., Plowman, G., Peale, F., French, D., Carano, R., Koch, A.W., Wu, Y., Watts, R.J., Tessier-Lavigne, M., Bagri, A., 2008. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 13, 331–342. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.029
- Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J., Ballmer-Hofer, K., 2006. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 63, 2067–2077. doi:10.1007/s00018-006-6254-9
- Chatterjee, S., Heukamp, L.C., Siobal, M., Schöttle, J., Wieczorek, C., Peifer, M., Frasca, D., Koker, M., König, K., Meder, L., Rauh, D., Buettner, R., Wolf, J., Brekken, R.A., Neumaier, B., Christofori, G., Thomas, R.K., Ullrich, R.T., 2013. Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 1732–1740. doi:10.1172/JCI65385
- Chen, T.T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S.M., Segura, T., Iruela-Arispe, M.L., 2010. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J. Cell Biol.* 188, 595–609. doi:10.1083/jcb.200906044
- Cheung, C.Y., Singh, M., Ebaugh, M.J., Brace, R.A., 1995. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 753–759.
- Christinger, H.W., Fuh, G., de Vos, A.M., Wiesmann, C., 2004. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J. Biol. Chem.* 279, 10382–10388. doi:10.1074/jbc.M313237200
- Chung, A.S., Kowanetz, M., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Finkle, D., Komuves, L., Peale, F., Ferrara, N., 2012. Differential drug class-specific metastatic effects following treatment with a panel of angiogenesis inhibitors. *J. Pathol.* 227, 404–416. doi:10.1002/path.4052
- Ciardiello F., Caputo R, Bianco R, Damiano V., Fontanini G., Cuccato S., De Placido S., Bianco A.R., Tortora G., 2001. *Clin Cancer Res.* Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. 7(5):1459-65.
- Cohen, C.D., Doran, P.P., Blattner, S.M., Merkle, M., Wang, G.Q., Schmid, H., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., Henger, A., Rastaldi, M.P., Kretzler, M., 2005. Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 1958–1965. doi:10.1681/ASN.2005020204
- Condeelis, J., Pollard, J.W., 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266. doi:10.1016/j.cell.2006.01.007
- Conley, S.J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A.N., Clouthier, S.G., Wicha, M.S., 2012. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation

- of tumor hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2784–2789.
doi:10.1073/pnas.1018866109
- Cudmore, M.J., Hewett, P.W., Ahmad, S., Wang, K.-Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., Miller, M.R., Newby, D.E., Gu, Y., Barleon, B., Weich, H., Ahmed, A., 2012. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat. Commun.* 3, 972. doi:10.1038/ncomms1977
- Custodio, A., Barriuso, J., de Castro, J., Martínez-Marín, V., Moreno, V., Rodríguez-Salas, N., Feliu, J., 2013. Molecular markers to predict outcome to antiangiogenic therapies in colorectal cancer: Current evidence and future perspectives. *Cancer Treat. Rev.* 39, 908–924. doi:10.1016/j.ctrv.2013.02.004

D

- Dachs, G.U., Steele, A.J., Coralli, C., Kanthou, C., Brooks, A.C., Gunningham, S.P., Currie, M.J., Watson, A.I., Robinson, B.A., Tozer, G.M., 2006. Anti-vascular agent Combretastatin A-4-P modulates hypoxia inducible factor-1 and gene expression. *BMC Cancer* 6, 280. doi:10.1186/1471-2407-6-280
- Decio A., Taraboletti G., Patton V., Alzani R, Perego P., Fruscio R, Jürgensmeier JM., Giavazzi R, Belotti D., 2014. Vascular endothelial growth factor c promotes ovarian carcinoma progression through paracrine and autocrine mechanisms. *Am J Pathol.* 184(4):1050-61. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.12.030.
- De Gramont, A., Van Cutsem, E., Schmoll, H.-J., Tabernero, J., Clarke, S., Moore, M.J., Cunningham, D., Cartwright, T.H., Hecht, J.R., Rivera, F., Im, S.-A., Bodoky, G., Salazar, R., Maindrault-Goebel, F., Shacham-Shmueli, E., Bajetta, E., Makrutzki, M., Shang, A., André, T., Hoff, P.M., 2012. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 13, 1225–1233. doi:10.1016/S1470-2045(12)70509-0
- Delcombel, R., Janssen, L., Vassy, R., Gammons, M., Haddad, O., Richard, B., Letourneur, D., Bates, D., Hendricks, C., Waltenberger, J., Starzec, A., Sounni, N.E., Noël, A., Deroanne, C., Lambert, C., Colige, A., 2013. New prospects in the roles of the C-terminal domains of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation. *Angiogenesis* 16, 353–371. doi:10.1007/s10456-012-9320-y
- Díaz, R., Peña, C., Silva, J., Lorenzo, Y., García, V., García, J.M., Sánchez, A., Espinosa, P., Yuste, R., Bonilla, F., Domínguez, G., 2008. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 123, 1060–1067. doi:10.1002/ijc.23619
- Dibbens, J.A., Miller, D.L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M.A., Goodall, G.J., 1999. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol. Biol. Cell* 10, 907–919.
- Djordjevic, S., Driscoll, P.C., 2013. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov. Today* 18, 447–455. doi:10.1016/j.drudis.2012.11.013
- Döme, B., Paku, S., Somlai, B., Tímár, J., 2002. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J. Pathol.* 197, 355–362. doi:10.1002/path.1124
- Dowhan, D.H., Hong, E.P., Auboeuf, D., Dennis, A.P., Wilson, M.M., Berget, S.M., O'Malley, B.W., 2005. Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol. Cell* 17, 429–439. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.025

E

- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., Kerbel, R.S., 2009. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232–239. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021
- Eder, J.P., Jr, Supko, J.G., Clark, J.W., Puchalski, T.A., Garcia-Carbonero, R., Ryan, D.P., Shulman, L.N., Proper, J., Kirvan, M., Rattner, B., Connors, S., Keogan, M.T., Janicek, M.J., Fogler, W.E., Schnipper, L., Kinchla, N., Sidor, C., Phillips, E., Folkman, J., Kufe, D.W., 2002. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 3772–3784.
- Edmond, V., Moysan, E., Khochbin, S., Matthias, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., Eymin, B., 2011. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J.* 30, 510–523. doi:10.1038/emboj.2010.333
- Eichmann, A., Simons, M., 2012. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 188–193. doi:10.1016/j.ceb.2012.02.002
- Elias, A.P., Dias, S., 2008. Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 1, 131–139. doi:10.1007/s12307-008-0013-4
- Ergorul, C., Ray, A., Huang, W., Darland, D., Luo, Z.K., Grosskreutz, C.L., 2008. Levels of vascular endothelial growth factor-A165b (VEGF-A165b) are elevated in experimental glaucoma. *Mol. Vis.* 14, 1517–1524.
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczyluk, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., Gorbunova, V., Bay, J.-O., Bodrogi, I., Jagiello-Gruszfeld, A., Moore, N., AVOREN Trial investigators, 2007. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 370, 2103–2111. doi:10.1016/S0140-6736(07)61904-7

F

- Fan, F., Gray, M.J., Dallas, N.A., Yang, A.D., Van Buren, G., 2nd, Camp, E.R., Ellis, L.M., 2008. Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3064–3070. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0615
- Fan, F., Samuel, S., Gaur, P., Lu, J., Dallas, N.A., Xia, L., Bose, D., Ramachandran, V., Ellis, L.M., 2011. Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. *Br. J. Cancer* 104, 1270–1277. doi:10.1038/bjc.2011.81
- Ferrara, N., 2000. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 55, 15–35; discussion 35–36.
- Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581–611. doi:10.1210/er.2003-0027
- Ferrara, N., 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 21–26. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.003
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4–25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., Novotny, W., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391–400. doi:10.1038/nrd1381
- Folkman, J., 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res.* 312, 594–607. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.015
- Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273–286. doi:10.1038/nrd2115

- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L., 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70. doi:10.1038/376066a0
- Foster, R.R., Saleem, M.A., Mathieson, P.W., Bates, D.O., Harper, S.J., 2005. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, F48–57. doi:10.1152/ajprenal.00146.2004
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., Cloughesy, T., 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4733–4740. doi:10.1200/JCO.2008.19.8721
- Fry, W.A., Phillips, J.L., Menck, H.R., 1999. Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* 86, 1867–1876.
- Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B., Wells, J.A., 1998. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 11197–11204.
- Fukasawa, M., Matsushita, A., Korc, M., 2007. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1173–1180.

G

- Gao, D., Nolan, D., McDonnell, K., Vahdat, L., Benezra, R., Altorki, N., Mittal, V., 2009. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1796, 33–40. doi:10.1016/j.bbcan.2009.05.001
- Gerber, H.-P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J.C., Ferrara, N., 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417, 954–958. doi:10.1038/nature00821
- Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., Betsholtz, C., 2004. Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 503–509. doi:10.1002/dvdy.20148
- Germann, S., Grataudou, L., Dutertre, M., Auboeuf, D., 2012. Splicing programs and cancer. *J. Nucleic Acids* 2012, 269570. doi:10.1155/2012/269570
- Giordano, R.J., Cardó-Vila, M., Salameh, A., Anobom, C.D., Zeitlin, B.D., Hawke, D.H., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Nör, J.E., Sidman, R.L., Pasqualini, R., Arap, W., 2010. From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5112–5117. doi:10.1073/pnas.0915141107
- Goede, V., Coutelle, O., Neuneier, J., Reinacher-Schick, A., Schnell, R., Koslowsky, T.C., Weihrauch, M.R., Cremer, B., Kashkar, H., Odenthal, M., Augustin, H.G., Schmiegel, W., Hallek, M., Hacker, U.T., 2010. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br. J. Cancer* 103, 1407–1414. doi:10.1038/sj.bjc.6605925
- Goel, H.L., Mercurio, A.M., 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer* 13, 871–882. doi:10.1038/nrc3627
- Goel, H.L., Pursell, B., Standley, C., Fogarty, K., Mercurio, A.M., 2012. Neuropilin-2 regulates $\alpha 6 \beta 1$ integrin in the formation of focal adhesions and signaling. *J. Cell Sci.* 125, 497–506. doi:10.1242/jcs.094433

- Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, Participating Institutions, 2007. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 2, 706–714. doi:10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a
- Gospodarowicz, D., Thakral, K.K., 1978. Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 847–851.
- Gourlaouen, M., Welte, J.C., Vasudev, N.S., Reynolds, A.R., 2013. Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 288, 7467–7480. doi:10.1074/jbc.M112.446401
- Gout, S., Brambilla, E., Boudria, A., Drissi, R., Lantuejoul, S., Gazzeri, S., Eymin, B., 2012. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PloS One* 7, e46539. doi:10.1371/journal.pone.0046539
- Grepin, R., Guyot, M., Jacquin, M., Durivault, J., Chamorey, E., Sudaka, A., Serdjebi, C., Lacarelle, B., Scoazec, J.-Y., Negrier, S., Simonnet, H., Pages, G., 2012. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 31, 1683–1694. doi:10.1038/onc.2011.360
- Gridelli, C., Peters, S., Sgambato, A., Casaluca, F., Adjei, A.A., Ciardiello, F., 2014. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat. Rev.* 40, 300–306. doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.002
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Yung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., Keshet, E., 2006. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175–189. doi:10.1016/j.cell.2005.10.036
- Grunstein, J., Masbad, J.J., Hickey, R., Giordano, F., Johnson, R.S., 2000. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7282–7291.
- Gu, C., Rodriguez, E.R., Reimert, D.V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L.J., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., 2003. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell* 5, 45–57.

H

- Hagberg, C.E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L.A., Samén, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., Klar, J., Genove, G., Pietras, K., Stone-Elander, S., Claesson-Welsh, L., Ylä-Herttuala, S., Lindahl, P., Eriksson, U., 2010. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464, 917–921. doi:10.1038/nature08945
- Hamerlik, P., Lathia, J.D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr, Fischer, W., Lukas, J., Rich, J.N., Bartek, J., 2012. Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J. Exp. Med.* 209, 507–520. doi:10.1084/jem.20111424
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hansma, A.H.G., Broxterman, H.J., van der Horst, I., Yuana, Y., Boven, E., Giaccone, G., Pinedo, H.M., Hoekman, K., 2005. Recombinant human endostatin administered as a 28-day continuous intravenous infusion, followed by daily subcutaneous injections: a phase I and

- pharmacokinetic study in patients with advanced cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 16, 1695–1701. doi:10.1093/annonc/mdi318
- Harper, S.J., Bates, D.O., 2008. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat. Rev. Cancer* 8, 880–887. doi:10.1038/nrc2505
- Harris, S., Craze, M., Newton, J., Fisher, M., Shima, D.T., Tozer, G.M., Kanthou, C., 2012. Do anti-angiogenic VEGF (VEGF_{xxx}b) isoforms exist? A cautionary tale. *PloS One* 7, e35231. doi:10.1371/journal.pone.0035231
- Hartsough, E.J., Meyer, R.D., Chitalia, V., Jiang, Y., Marquez, V.E., Zhdanova, I.V., Weinberg, J., Costello, C.E., Rahimi, N., 2013. Lysine methylation promotes VEGFR-2 activation and angiogenesis. *Sci. Signal.* 6, ra104. doi:10.1126/scisignal.2004289
- He, Z., Tessier-Lavigne, M., 1997. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739–751.
- Hegde, P.S., Jubb, A.M., Chen, D., Li, N.F., Meng, Y.G., Bernaards, C., Elliott, R., Scherer, S.J., Chen, D.S., 2013. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 929–937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2535
- Herbst, R.S., O'Neill, V.J., Fehrenbacher, L., Belani, C.P., Bonomi, P.D., Hart, L., Melnyk, O., Ramies, D., Lin, M., Sandler, A., 2007. Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 4743–4750. doi:10.1200/JCO.2007.12.3026
- Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R., Neufeld, G., 2001. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech. Dev.* 109, 115–119.
- Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 1011–1027. doi:10.1200/JCO.2005.06.081
- Hodivala-Dilke, K.M., McHugh, K.P., Tsakiris, D.A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Culleré, M., Ross, F.P., Collier, B.S., Teitelbaum, S., Hynes, R.O., 1999. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.* 103, 229–238. doi:10.1172/JCI5487
- Holmes, D.I.R., Zachary, I., 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 6, 209. doi:10.1186/gb-2005-6-2-209
- Hong, T.-M., Chen, Y.-L., Wu, Y.-Y., Yuan, A., Chao, Y.-C., Chung, Y.-C., Wu, M.-H., Yang, S.-C., Pan, S.-H., Shih, J.-Y., Chan, W.-K., Yang, P.-C., 2007. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 4759–4768. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0001
- Horowitz, A., Seerapu, H.R., 2012. Regulation of VEGF signaling by membrane traffic. *Cell. Signal.* 24, 1810–1820. doi:10.1016/j.cellsig.2012.05.007
- Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., Ferrara, N., 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031–26037.
- Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., Chen, Y.L., 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27, 3746–3753. doi:10.1038/sj.onc.1211029
- Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M.J., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., Cheng, S.Y., 2007. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 26, 5577–5586. doi:10.1038/sj.onc.1210348
- Hurwitz, H., 2004. Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 4 Suppl 2, S62–68.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.
- Imielinski, M., Berger, A.H., Hammerman, P.S., Hernandez, B., Pugh, T.J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., Sougnez, C., Auclair, D., Lawrence, M.S., Stojanov, P., Cibulskis, K., Choi, K., de Waal, L., Sharifnia, T., Brooks, A., Greulich, H., Banerji, S.,

- Zander, T., Seidel, D., Leenders, F., Ansén, S., Ludwig, C., Engel-Riedel, W., Stoelben, E., Wolf, J., Goparju, C., Thompson, K., Winckler, W., Kwiatkowski, D., Johnson, B.E., Jänne, P.A., Miller, V.A., Pao, W., Travis, W.D., Pass, H.I., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Thomas, R.K., Garraway, L.A., Getz, G., Meyerson, M., 2012. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 150, 1107–1120. doi:10.1016/j.cell.2012.08.029
- Hynes N.E., MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. 2009. *Curr Opin Cell Biol.* 21(2):177-84. doi: 10.1016/j.ceb.2008.12.010.

I

- Inoue, K., Ozeki, Y., Suganuma, T., Sugiura, Y., Tanaka, S., 1997. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer* 79, 206–213.
- Ishida J., Onishi M., Kurozumi K., Ichikawa T., Fujii K., Shimazu Y., Oka T., Date I., 2014. Integrin Inhibitor Suppresses Bevacizumab-Induced Glioma Invasion. *Transl Oncol.* S1936-5233(14)00017-5.
- Ito, N., Wernstedt, C., Engström, U., Claesson-Welsh, L., 1998. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J. Biol. Chem.* 273, 23410–23418.

J

- Jahangiri, A., Aghi, M.K., Carbonell, W.S., 2014. β 1 integrin: Critical path to antiangiogenic therapy resistance and beyond. *Cancer Res.* 74, 3–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1742
- Jain, R.K., 2005. Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncol. Williston Park* 19, 7–16.
- Jalal, S., Bedano, P., Einhorn, L., Bhatia, S., Ansari, R., Bechar, N., Koneru, K., Govindan, R., Wu, J., Yu, M., Schneider, B., Hanna, N., 2010. Paclitaxel plus bevacizumab in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer: a safety, feasibility, and efficacy study from the Hoosier Oncology Group. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 5, 2008–2011. doi:10.1097/JTO.0b013e3181f77b6e
- Jayson, G.C., Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2012. Antiangiogenic therapy--evolving view based on clinical trial results. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 297–303. doi:10.1038/nrclinonc.2012.8
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., 2008. Cancer statistics, 2008. *CA. Cancer J. Clin.* 58, 71–96. doi:10.3322/CA.2007.0010
- Johnson, B.E., Kabbinar, F., Fehrenbacher, L., Hainsworth, J., Kasubhai, S., Kressel, B., Lin, C.-Y., Marsland, T., Patel, T., Polikoff, J., Rubin, M., White, L., Yang, J.C.-H., Bowden, C., Miller, V., 2013. ATLAS: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIB trial comparing bevacizumab therapy with or without erlotinib, after completion of chemotherapy, with bevacizumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3926–3934. doi:10.1200/JCO.2012.47.3983
- Joyce, J.A., Pollard, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252. doi:10.1038/nrc2618

- Ju L, Zhou C. Integrin beta 1 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with gefitinib resistance of non-small cell lung cancer. 2013. *Cancer Biomark.* 13(5):329-36. doi: 10.3233/CBM-130362.
- Jubb, A.M., Miller, K.D., Rugo, H.S., Harris, A.L., Chen, D., Reimann, J.D., Cobleigh, M.A., Schmidt, M., Langmuir, V.K., Hillan, K.J., Chen, D.S., Koeppen, H., 2011. Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 372–381. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1791

K

- Kajdaniuk, D., Marek, B., Borgiel-Marek, H., Kos-Kudła, B., 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol. Pol.* 62, 444–455.
- Kalluri, R., 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433. doi:10.1038/nrc1094
- Karkkainen, M.J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T.V., Jeltsch, M., Jackson, D.G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C., Alitalo, K., 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74–80. doi:10.1038/ni1013
- Kärpänen, T., Heckman, C.A., Kesitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., Alitalo, K., 2006. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1462–1472. doi:10.1096/fj.05-5646com
- Kaseb, A.O., Garrett-Mayer, E., Morris, J.S., Xiao, L., Lin, E., Onicescu, G., Hassan, M.M., Hassabo, H.M., Iwasaki, M., Deaton, F.L., Abbruzzese, J.L., Thomas, M.B., 2012. Efficacy of bevacizumab plus erlotinib for advanced hepatocellular carcinoma and predictors of outcome: final results of a phase II trial. *Oncology* 82, 67–74. doi:10.1159/000335963
- Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., Satow, Y., 1995. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 55, 5687–5692.
- Kawai, H., Minamiya, Y., Ito, M., Saito, H., Ogawa, J., 2008. VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer Amst. Neth.* 59, 41–47. doi:10.1016/j.lungcan.2007.08.001
- Kawamura, H., Li, X., Harper, S.J., Bates, D.O., Claesson-Welsh, L., 2008. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res.* 68, 4683–4692. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6577
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H., 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4895–4902.
- Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., Kawaguchi, S., Nagoya, S., Shindoh, M., Higashino, F., Mezawa, F., Okada, F., Ishii, S., 2000. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 572–577.
- Kelly, B.D., Hackett, S.F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P.A., Semenza, G.L., 2003. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ. Res.* 93, 1074–1081. doi:10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B
- Kent, D.L., 2014. Age-related macular degeneration: beyond anti-angiogenesis. *Mol. Vis.* 20, 46–55.

- Kim, J.-W., Koh, Y., Kim, D.-W., Ahn, Y.-O., Kim, T.M., Han, S.-W., Oh, D.-Y., Lee, S.-H., Im, S.-A., Kim, T.-Y., Heo, D.S., Bang, Y.-J., 2013. Clinical Implications of VEGF, TGF- β 1, and IL-1 β in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* 45, 325–333. doi:10.4143/crt.2013.45.4.325
- Kim, T.J., Ravoori, M., Landen, C.N., Kamat, A.A., Han, L.Y., Lu, C., Lin, Y.G., Merritt, W.M., Jennings, N., Spannuth, W.A., Langley, R., Gershenson, D.M., Coleman, R.L., Kundra, V., Sood, A.K., 2007. Antitumor and antivascular effects of AVE8062 in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 67, 9337–9345. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4018
- Kindler, H.L., Ioka, T., Richel, D.J., Bennouna, J., L  tourney, R., Okusaka, T., Funakoshi, A., Furuse, J., Park, Y.S., Ohkawa, S., Springett, G.M., Wasan, H.S., Trask, P.C., Bycott, P., Ricart, A.D., Kim, S., Van Cutsem, E., 2011. Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study. *Lancet Oncol.* 12, 256–262. doi:10.1016/S1470-2045(11)70004-3
- Koch, S., Claesson-Welsh, L., 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006502. doi:10.1101/cshperspect.a006502
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., Claesson-Welsh, L., 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 437, 169–183. doi:10.1042/BJ20110301
- Koch, S., van Meeteren, L.A., Morin, E., Testini, C., Westr  m, S., Bj  rkelund, H., Le Jan, S., Adler, J., Berger, P., Claesson-Welsh, L., 2014. NRP1 Presented in trans to the Endothelium Arrests VEGFR2 Endocytosis, Preventing Angiogenic Signaling and Tumor Initiation. *Dev. Cell* 28, 633–646. doi:10.1016/j.devcel.2014.02.010
- Konopatskaya, O., Churchill, A.J., Harper, S.J., Bates, D.O., Gardiner, T.A., 2006. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol. Vis.* 12, 626–632.
- Korpanty, G., Smyth, E., Carney, D.N., 2011. Update on anti-angiogenic therapy in non-small cell lung cancer: Are we making progress? *J. Thorac. Dis.* 3, 19–29. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2010.11.11
- Kreuter, M., Woelke, K., Bieker, R., Schliemann, C., Steins, M., Buechner, T., Berdel, W.E., Mesters, R.M., 2006. Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 1950–1954. doi:10.1038/sj.leu.2404384
- Kulke, M.H., Bergsland, E.K., Ryan, D.P., Enzinger, P.C., Lynch, T.J., Zhu, A.X., Meyerhardt, J.A., Heymach, J.V., Fogler, W.E., Sidor, C., Michelini, A., Kinsella, K., Venook, A.P., Fuchs, C.S., 2006. Phase II study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 3555–3561. doi:10.1200/JCO.2006.05.6762
- Kumar R., Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis. 2001. *Semin Oncol.* 28(5 Suppl 16):27-32.
- Kunizaki, M., Hamamoto, R., Silva, F.P., Yamaguchi, K., Nagayasu, T., Shibuya, M., Nakamura, Y., Furukawa, Y., 2007. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res.* 67, 10759–10765. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1132
- Kurup, A., Lin, C.-W., Murry, D.J., Dobrolecki, L., Estes, D., Yiannoutsos, C.T., Mariano, L., Sidor, C., Hickey, R., Hanna, N., 2006. Recombinant human angiostatin (rhAngiostatin) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study from Indiana University. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 17, 97–103. doi:10.1093/annonc/mdj055

L

- Ladomery, M.R., Harper, S.J., Bates, D.O., 2007. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett.* 249, 133–142. doi:10.1016/j.canlet.2006.08.015
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., Huot, J., 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* 100, 782–794. doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
- Lambrechts, D., Lenz, H.-J., de Haas, S., Carmeliet, P., Scherer, S.J., 2013. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 1219–1230. doi:10.1200/JCO.2012.46.2762
- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., Al-Chalabi, A., Bornes, S., Musson, R., Hansen, V., Beckman, L., Adolfsson, R., Pall, H.S., Prats, H., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Katayama, S., Awata, T., Leigh, N., Lang-Lazdunski, L., Dewerchin, M., Shaw, C., Moons, L., Vlietinck, R., Morrison, K.E., Robberecht, W., Van Broeckhoven, C., Collen, D., Andersen, P.M., Carmeliet, P., 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34, 383–394. doi:10.1038/ng1211
- Lanahan, A.A., Hermans, K., Claes, F., Kerley-Hamilton, J.S., Zhuang, Z.W., Giordano, F.J., Carmeliet, P., Simons, M., 2010. VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev. Cell* 18, 713–724. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.016
- Lantuéjoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J., Brambilla, E., 2003. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J. Pathol.* 200, 336–347. doi:10.1002/path.1367
- Larrayoz, M., Pio, R., Pajares, M.J., Zudaire, I., Ajona, D., Casanovas, O., Montuenga, L.M., Agorreta, J., 2014. Contrasting responses of non-small cell lung cancer to antiangiogenic therapies depend on histological subtype. *EMBO Mol. Med.* 6, 539–550. doi:10.1002/emmm.201303214
- Larsen, A.K., Ouaret, D., El Ouadrani, K., Petitprez, A., 2011. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* 131, 80–90. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.03.012
- Lee, T.-H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H.K., Avraham, S., 2007. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 4, e186. doi:10.1371/journal.pmed.0040186
- Lee, Y.H., Tokunaga, T., Oshika, Y., Suto, R., Yanagisawa, K., Tomisawa, M., Fukuda, H., Nakano, H., Abe, S., Tateishi, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y., Nakamura, M., 1999. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 35, 1089–1093.
- Li, X., Eriksson, U., 2001. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 421–426.
- Li, X., Kumar, A., Zhang, F., Lee, C., Tang, Z., 2012. Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends Mol. Med.* 18, 119–127. doi:10.1016/j.molmed.2011.11.006
- Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T.D., Sievers, R.E., Chorianopoulos, E., Wada, H., Vanwildemeersch, M., Noel, A., Foidart, J.-M., Springer, M.L., von Degenfeld, G., Dewerchin, M., Blau, H.M., Alitalo, K., Eriksson, U., Carmeliet, P., Moons, L., 2008. Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1614–1620. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158725
- Lichtenberger, B.M., Tan, P.K., Niederleithner, H., Ferrara, N., Petzelbauer, P., Sibilio, M., 2010. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 140, 268–279. doi:10.1016/j.cell.2009.12.046
- Lima, A.B.C., Macedo, L.T., Sasse, A.D., 2011. Addition of bevacizumab to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 6, e22681. doi:10.1371/journal.pone.0022681

- Limaverde-Sousa, G., Sternberg, C., Ferreira, C.G., 2014. Antiangiogenesis beyond VEGF inhibition: a journey from antiangiogenic single-target to broad-spectrum agents. *Cancer Treat. Rev.* 40, 548–557. doi:10.1016/j.ctrv.2013.11.009
- Louzier, V., Raffestin, B., Leroux, A., Branellec, D., Caillaud, J.M., Levame, M., Eddahibi, S., Adnot, S., 2003. Role of VEGF-B in the lung during development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L926–937. doi:10.1152/ajplung.00247.2002
- Lu, J.-F., Bruno, R., Eppler, S., Novotny, W., Lum, B., Gaudreault, J., 2008. Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62, 779–786. doi:10.1007/s00280-007-0664-8

M

- Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M.J., Squartini, F., Angeletti, C.A., 1992. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340, 145–146.
- Maeda, K., Chung, Y.S., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, S.M., Ogawa, M., Sawada, T., Sowa, M., 1996. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77, 858–863.
- Mak, P., Leav, I., Pursell, B., Bae, D., Yang, X., Taglienti, C.A., Gouvin, L.M., Sharma, V.M., Mercurio, A.M., 2010. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 17, 319–332. doi:10.1016/j.ccr.2010.02.030
- Mancuso, A., Sternberg, C.N., 2006. New treatment approaches in metastatic renal cell carcinoma. *Curr. Opin. Urol.* 16, 337–341. doi:10.1097/01.mou.0000240305.78205.77
- Manetti, M., Guiducci, S., Ibbi-Manneschi, L., Matucci-Cerinic, M., 2011. Impaired angiogenesis in systemic sclerosis: the emerging role of the antiangiogenic VEGF(165)b splice variant. *Trends Cardiovasc. Med.* 21, 204–210. doi:10.1016/j.tcm.2012.05.011
- Masoumi Moghaddam, S., Amini, A., Morris, D.L., Pourgholami, M.H., 2012. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 143–162. doi:10.1007/s10555-011-9337-5
- Matsushita, A., Götze, T., Korc, M., 2007. Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res.* 67, 10309–10316. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3256
- Matsuyama, M., Chijiwa, T., Inoue, Y., Abe, Y., Nishi, M., Miyazaki, N., Furukawa, D., Mukai, M., Suemizu, H., Sekido, Y., Ueyama, Y., Nakamura, M., 2009. Alternative splicing variant of vascular endothelial growth factor-A is a critical prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 22, 1407–1413.
- Mattot, V., Moons, L., Lupu, F., Chernavsky, D., Gómez, R.A., Collen, D., Carmeliet, P., 2002. Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13, 1548–1560.
- McCarty, J.H., 2013. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy: has the challenge been MET? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 1631–1633. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0051
- Medinger, M., Fischer, N., Tzankov, A., 2010. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hemato-lymphoid malignancies. *J. Oncol.* 2010, 729725. doi:10.1155/2010/729725
- Melero-Martin, J.M., Dudley, A.C., 2011. Concise review: Vascular stem cells and tumor angiogenesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 163–168. doi:10.1002/stem.583
- Merdzhanova, G., Gout, S., Keramidas, M., Edmond, V., Coll, J.-L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., Eymin, B., 2010. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth

- factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene* 29, 5392–5403. doi:10.1038/onc.2010.281
- Miao, H.Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., Klagsbrun, M., 2000. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 2532–2539. doi:10.1096/fj.00-0250com
- Miles, D.W., de Haas, S.L., Dirix, L.Y., Romieu, G., Chan, A., Pivot, X., Tomczak, P., Provencher, L., Cortés, J., Delmar, P.R., Scherer, S.J., 2013. Biomarker results from the AVADO phase 3 trial of first-line bevacizumab plus docetaxel for HER2-negative metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* 108, 1052–1060. doi:10.1038/bjc.2013.69
- Miller-Kasprzak, E., Jagodziński, P.P., 2008. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 62, 158–163. doi:10.1016/j.biopha.2007.07.015
- Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T., Caro, J., 1994. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 35–39.
- Mineur, P., Colige, A.C., Deroanne, C.F., Dubail, J., Kesteloot, F., Habraken, Y., Noël, A., Vöö, S., Waltenberger, J., Lapière, C.M., Nusgens, B.V., Lambert, C.A., 2007. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J. Cell Biol.* 179, 1261–1273. doi:10.1083/jcb.200703052
- Mitra, S.K., Schlaepfer, D.D., 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516–523. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.011
- Moserle, L., Jiménez-Valerio, G., Casanovas, O., 2014. Antiangiogenic therapies: going beyond their limits. *Cancer Discov.* 4, 31–41. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0199
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T., Chen, I., Bycott, P.W., Baum, C.M., Figlin, R.A., 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356, 115–124. doi:10.1056/NEJMoa065044
- Mountzios, G., Pentheroudakis, G., Carmeliet, P., 2014. Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacol. Ther.* 141, 117–124. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.09.003
- Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., de Vos, A.M., 1997. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7192–7197.
- Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Tosato, G., 2005. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 105, 1992–1999. doi:10.1182/blood-2004-07-2598

N

- Nam, J.-M., Chung, Y., Hsu, H.C., Park, C.C., 2009. beta1 integrin targeting to enhance radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 923–928. doi:10.3109/09553000903232876
- Naumov, G.N., Townson, J.L., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Bramwell, V.H.C., Groom, A.C., Chambers, A.F., 2003. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. *Breast Cancer Res. Treat.* 82, 199–206. doi:10.1023/B:BREA.00000004377.12288.3c
- Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, Briggs A, Straume O, Akslen LA, Lifshits E, Byers LA, Xu L, Wu HK, Jänne P, Kobayashi S, Halmos B, Tenen D, Tang XM, Engelman J, Yeap B, Folkman J, Johnson BE, Heymach JV. Combined vascular endothelial growth factor receptor

- and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. 2009. *Clin Cancer Res.* 15(10):3484-94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2904.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13, 9–22.
- Ng, Y.S., Rohan, R., Sunday, M.E., Demello, D.E., D'Amore, P.A., 2001. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 220, 112–121. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1093>3.0.CO;2-D
- Nikolinakos, P.G., Altorki, N., Yankelevitz, D., Tran, H.T., Yan, S., Rajagopalan, D., Bordogna, W., Ottesen, L.H., Heymach, J.V., 2010. Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res.* 70, 2171–2179. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2533
- Nowak, D.G., Amin, E.M., Rennel, E.S., Hoareau-Aveilla, C., Gammons, M., Damodoran, G., Hagiwara, M., Harper, S.J., Woolard, J., Lodomery, M.R., Bates, D.O., 2010. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 5532–5540. doi:10.1074/jbc.M109.074930
- Nowak, D.G., Woolard, J., Amin, E.M., Konopatskaya, O., Saleem, M.A., Churchill, A.J., Lodomery, M.R., Harper, S.J., Bates, D.O., 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* 121, 3487–3495. doi:10.1242/jcs.016410
- Nozawa, H., Chiu, C., Hanahan, D., 2006. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12493–12498. doi:10.1073/pnas.0601807103

O

- Oka, T., Akazawa, H., Naito, A.T., Komuro, I., 2014. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ. Res.* 114, 565–571. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300507
- Okada, F., Rak, J.W., Croix, B.S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kerbel, R.S., 1998. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3609–3614.
- Olaussen, K.A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H.H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J.-P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J.-C., IALT Bio Investigators, 2006. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355, 983–991. doi:10.1056/NEJMoa060570
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., Frese, K.K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S.P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W.J., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Rückert, F., Grützmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S.R., Huang, P., Davies, S.E., Plunkett, W., Egorin, M., Hruban, R.H., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Iacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J., Tuveson, D.A., 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457–1461. doi:10.1126/science.1171362

- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudenbach, V., Vermeylen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Van Den Bosch, L., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M.R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D.J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K.H., Robberecht, W., Herbert, J.M., Collen, D., Carmeliet, P., 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131–138. doi:10.1038/88842
- Osada, H., Takahashi, T., 2002. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 21, 7421–7434. doi:10.1038/sj.onc.1205802

P

- Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., Casanovas, O., 2009. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 15, 220–231. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.027
- Pagès, G., Pouyssegur, J., 2005. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 564–573. doi:10.1016/j.cardiores.2004.09.032
- Pajares, M.J., Agorreta, J., Larrayoz, M., Vesin, A., Ezponda, T., Zudaire, I., Torre, W., Lozano, M.D., Brambilla, E., Brambilla, C., Wistuba, I.I., Behrens, C., Timsit, J.-F., Pio, R., Field, J.K., Montuenga, L.M., 2012. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 1129–1136. doi:10.1200/JCO.2011.37.4231
- Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W.-C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R.K., Kowalski, J., Yee, S.F., Pacheco, G., Ross, S., Cheng, Z., Le Couter, J., Plowman, G., Peale, F., Koch, A.W., Wu, Y., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Watts, R.J., 2007. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11, 53–67. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.018
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., Blencowe, B.J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40, 1413–1415. doi:10.1038/ng.259
- Park, C.C., Bissell, M.J., Barcellos-Hoff, M.H., 2000. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today* 6, 324–329.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N., 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646–25654.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 74–108.
- Patel, J.D., Socinski, M.A., Garon, E.B., Reynolds, C.H., Spigel, D.R., Olsen, M.R., Hermann, R.C., Jotte, R.M., Beck, T., Richards, D.A., Guba, S.C., Liu, J., Frimodt-Moller, B., John, W.J., Obasaju, C.K., Pennella, E.J., Bonomi, P., Govindan, R., 2013. PointBreak: a randomized phase III study of pemetrexed plus carboplatin and bevacizumab followed by maintenance pemetrexed and bevacizumab versus paclitaxel plus carboplatin and bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patients with stage IIIB or IV nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 4349–4357. doi:10.1200/JCO.2012.47.9626
- Patnaik, A., Lorusso, P.M., Messersmith, W.A., Papadopoulos, K.P., Gore, L., Beeram, M., Ramakrishnan, V., Kim, A.H., Beyer, J.C., Mason Shih, L., Darbonne, W.C., Xin, Y., Yu, R.,

- Xiang, H., Brachmann, R.K., Weekes, C.D., 2014. A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73, 951–960. doi:10.1007/s00280-014-2426-8
- Peiris-Pagès, M., Harper, S.J., Bates, D.O., Ramani, P., 2010. Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth. *J. Pathol.* 222, 138–147. doi:10.1002/path.2746
- Perrin, R.M., Konopatskaya, O., Qiu, Y., Harper, S., Bates, D.O., Churchill, A.J., 2005. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48, 2422–2427. doi:10.1007/s00125-005-1951-8
- Perrot-Appianat, M., Di Benedetto, M., 2012. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adhes. Migr.* 6, 547–553. doi:10.4161/cam.23332
- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol.* 1997. 151(6):1523-30.
- Plouët, J., Moro, F., Bertagnolli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., Bayard, F., 1997. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J. Biol. Chem.* 272, 13390–13396.
- Poindessous, V., Ouaret, D., El Ouadrani, K., Battistella, A., Mégaloophonos, V.F., Kamsu-Kom, N., Petitprez, A., Escargueil, A.E., Boudou, P., Dumont, S., Cervera, P., Fléjou, J.-F., André, T., Tournigand, C., Chibaudel, B., de Gramont, A., Larsen, A.K., 2011. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6522–6530. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1607
- Poon RT., Lau CP., Cheung ST., Yu WC., Fan ST., 2003. Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 63(12):3121-6.
- Pore N., Jiang Z, Gupta A., Cerniglia G., Kao G.D., Maity A., 2006. *Cancer Res.* EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. 66(6):3197-204.
- Price, T.J., Hardingham, J.E., Lee, C.K., Weickhardt, A., Townsend, A.R., Wrin, J.W., Chua, A., Shivasami, A., Cummins, M.M., Murone, C., Tebbutt, N.C., 2011. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2675–2682. doi:10.1200/JCO.2010.34.5520
- Pritchard-Jones, R.O., Dunn, D.B.A., Qiu, Y., Varey, A.H.R., Orlando, A., Rigby, H., Harper, S.J., Bates, D.O., 2007. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 97, 223–230. doi:10.1038/sj.bjc.6603839
- Punt CJ, Tol J. More is less: combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009. 6(12):731-3. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.168.

- Qian, B.-Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
- Qiang, H., Zhang, C., Shi, Z., Ling, M., 2012. [Neuroprotective effects of recombinant adeno-associated virus expressing vascular endothelial growth factor on rat traumatic spinal cord injury and its mechanism]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiu Fu Chongjian Waik Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.* 26, 724–730.
- Qiu, Y., Bevan, H., Weeraperuma, S., Wrating, D., Murphy, D., Neal, C.R., Bates, D.O., Harper, S.J., 2008. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 1104–1112. doi:10.1096/fj.07-9718com
- Qiu, Y., Hoareau-Aveilla, C., Oltean, S., Harper, S.J., Bates, D.O., 2009. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1207–1213. doi:10.1042/BST0371207
- Quaegebeur, A., Lange, C., Carmeliet, P., 2011. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71, 406–424. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.013

R

- Ramlau, R., Gorbunova, V., Ciuleanu, T.E., Novello, S., Ozguroglu, M., Goksel, T., Baldotto, C., Bennouna, J., Shepherd, F.A., Le-Guennec, S., Rey, A., Miller, V., Thatcher, N., Scagliotti, G., 2012. Afibercept and Docetaxel versus Docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a randomized, controlled phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3640–3647. doi:10.1200/JCO.2012.42.6932
- Ranpura, V., Hapani, S., Wu, S., 2011. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 305, 487–494. doi:10.1001/jama.2011.51
- Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., Leighl, N., Mezger, J., Archer, V., Moore, N., Manegold, C., 2009. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1227–1234. doi:10.1200/JCO.2007.14.5466
- Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., Leighl, N., Mezger, J., Archer, V., Moore, N., Manegold, C., BO17704 Study Group, 2010. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAIL). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 21, 1804–1809. doi:10.1093/annonc/mdq020
- Rennel, E., Waine, E., Guan, H., Schuler, Y., Leenders, W., Woolard, J., Sugiono, M., Gillatt, D., Kleinerman, E., Bates, D., Harper, S., 2008. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br. J. Cancer* 98, 1250–1257. doi:10.1038/sj.bjc.6604309
- Reymond, N., Im, J.H., Garg, R., Vega, F.M., Borda d'Agua, B., Riou, P., Cox, S., Valderrama, F., Muschel, R.J., Ridley, A.J., 2012. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through $\beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* 199, 653–668. doi:10.1083/jcb.201205169
- Robinson, S.D., Reynolds, L.E., Kostourou, V., Reynolds, A.R., da Silva, R.G., Tavora, B., Baker, M., Marshall, J.F., Hodivala-Dilke, K.M., 2009. Alpha v beta 3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 33966–33981. doi:10.1074/jbc.M109.030700
- Rogoziński, P., Bruliński, K., Malinowski, E., Kucharzewski, M., 2012. [Is the vascular-endothelial growth factor responsible for the malignancy of lung cancer?]. *Pol. Merk. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* 33, 213–216.

- Roskoski, R., Jr, 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62, 179–213. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.01.006
- Rossi, A., Maione, P., Ferrara, M.L., Sacco, P.C., Schettino, C., Bareschino, M.A., Gridelli, C., 2009. Angiogenesis inhibitors and vascular disrupting agents in non-small cell lung cancer. *Curr. Med. Chem.* 16, 3919–3930.
- Rossignol, M., Gagnon, M.L., Klagsbrun, M., 2000. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70, 211–222. doi:10.1006/geno.2000.6381
- Rubenstein, J.L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D.F., Shuman, M.A., 2000. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia N. Y. N* 2, 306–314

S

- Sakamoto, S., Ryan, A.J., Kyprianou, N., 2008. Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. *J. Cell. Biochem.* 103, 691–708. doi:10.1002/jcb.21442
- Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. 2007. *J Clin Oncol.* 25(29):4557-61.
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., Johnson, D.H., 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542–2550. doi:10.1056/NEJMoa061884
- Sandler, A.B., 2006. Advanced non-small-cell lung cancer: new data, therapy choices, and challenging decisions. *Oncol. Williston Park N* 20, 626–628.
- Sathornsumetee, S., Cao, Y., Marcello, J.E., Herndon, J.E., 2nd, McLendon, R.E., Desjardins, A., Friedman, H.S., Dewhirst, M.W., Vredenburgh, J.J., Rich, J.N., 2008. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 271–278. doi:10.1200/JCO.2007.13.3652
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Shibuya, M., 1997. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 487–491. doi:10.1006/bbrc.1997.7327
- Schiller, J.H., Harrington, D., Belani, C.P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., Johnson, D.H., Eastern Cooperative Oncology Group, 2002. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 346, 92–98. doi:10.1056/NEJMoa011954
- Semenza, G.L., 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 588–594.
- Sennino, B., Ishiguro-Oonuma, T., Wei, Y., Naylor, R.M., Williamson, C.W., Bhagwandin, V., Tabruyn, S.P., You, W.-K., Chapman, H.A., Christensen, J.G., Aftab, D.T., McDonald, D.M., 2012. Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discov.* 2, 270–287. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0240
- Seto, T., Kiura, K., Nishio, M., Nakagawa, K., Maemondo, M., Inoue, A., Hida, T., Yamamoto, N., Yoshioka, H., Harada, M., Ohe, Y., Nogami, N., Takeuchi, K., Shimada, T., Tanaka, T., Tamura, T., 2013. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol.* 14, 590–598. doi:10.1016/S1470-2045(13)70142-6
- Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Jung YD, Tseng WW, Drazan KE, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to

- vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. 2001. *Br J Cancer*. 85(4):584-9.
- Shaked, Y., Ciarrocchi, A., Franco, M., Lee, C.R., Man, S., Cheung, A.M., Hicklin, D.J., Chaplin, D., Foster, F.S., Benezra, R., Kerbel, R.S., 2006. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 313, 1785–1787. doi:10.1126/science.1127592
- Sharma, S.V., Gajowniczek, P., Way, I.P., Lee, D.Y., Jiang, J., Yuza, Y., Classon, M., Haber, D.A., Settleman, J., 2006. A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell* 10, 425–435. doi:10.1016/j.ccr.2006.09.014
- Shibuya, M., 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 469–478.
- Shibuya, M., 2013. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem. (Tokyo)* 153, 13–19. doi:10.1093/jb/mvs136
- Shima, D.T., Deutsch, U., D’Amore, P.A., 1995. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.* 370, 203–208.
- Shima, D.T., Kuroki, M., Deutsch, U., Ng, Y.S., Adamis, A.P., D’Amore, P.A., 1996. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J. Biol. Chem.* 271, 3877–3883.
- Shin DH, Lee HJ, Min HY, Choi SP, Lee MS, Lee JW, Johnson FM, Mehta K, Lippman SM, Glisson BS, Lee HY. Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin β 3-Src pathway. 2013. *J Natl Cancer Inst.* 105(20):1558-70. doi: 10.1093/jnci/djt263.
- Shivapurkar, N., Wiethage, T., Wistuba, I.I., Milchgrub, S., Muller, K.M., Gazdar, A.F., 2000. Presence of simian virus 40 sequences in malignant pleural, peritoneal and noninvasive mesotheliomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 85, 743–745.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E., 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843–845. doi:10.1038/359843a0
- Siemann, D.W., Shi, W., 2008. Dual targeting of tumor vasculature: combining Avastin and vascular disrupting agents (CA4P or OXi4503). *Anticancer Res.* 28, 2027–2031.
- Smith, R.A., Tang, J., Tudur-Smith, C., Neoptolemos, J.P., Ghaneh, P., 2011. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 104, 1440–1451. doi:10.1038/bjc.2011.110
- Soker, S., Miao, H.-Q., Nomi, M., Takashima, S., Klagsbrun, M., 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* 85, 357–368.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., Bussolino, F., 1999. Role of α v β 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 18, 882–892. doi:10.1093/emboj/18.4.882
- Sondell, M., Lundborg, G., Kanje, M., 1999. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Res.* 846, 219–228.
- Sorkin, A., von Zastrow, M., 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 609–622. doi:10.1038/nrm2748
- Stalmans, I., Ng, Y.-S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D.J., Gardiner, T., Hammes, H.-P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P., D’Amore, P.A., 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* 109, 327–336. doi:10.1172/JCI14362
- Stella, G.M., Luisetti, M., Pozzi, E., Comoglio, P.M., 2013. Oncogenes in non-small-cell lung cancer: emerging connections and novel therapeutic dynamics. *Lancet Respir. Med.* 1, 251–261. doi:10.1016/S2213-2600(13)70009-2
- Stuttfield, E., Ballmer-Hofer, K., 2009. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915–922. doi:10.1002/iub.234

- Sugahara, K.N., Teesalu, T., Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Agemy, L., Greenwald, D.R., Ruoslahti, E., 2010. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 328, 1031–1035. doi:10.1126/science.1183057
- Sulpice, E., Plouët, J., Bergé, M., Allanic, D., Tobelem, G., Merkulova-Rainon, T., 2008. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* 111, 2036–2045. doi:10.1182/blood-2007-04-084269
- Sultan, M., Schulz, M.H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., Schmidt, D., O’Keeffe, S., Haas, S., Vingron, M., Lehrach, H., Yaspo, M.-L., 2008. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 321, 956–960. doi:10.1126/science.1160342
- Sung, H.-K., Michael, I.P., Nagy, A., 2010. Multifaceted role of vascular endothelial growth factor signaling in adult tissue physiology: an emerging concept with clinical implications. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 206–212. doi:10.1097/MOH.0b013e32833865e6

T

- Takahashi, H., Shibuya, M., 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 109, 227–241. doi:10.1042/CS20040370
- Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M., 1999. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18, 2221–2230. doi:10.1038/sj.onc.1202527
- Tan, D.S., Camilleri-Broët, S., Tan, E.H., Alifano, M., Lim, W.-T., Bobbio, A., Zhang, S., Ng, Q.-S., Ang, M.-K., Iyer, N.G., Takano, A., Lim, K.H., Régnard, J.-F., Tan, P., Broët, P., 2014. Intertumour heterogeneity of non-small cell lung carcinomas revealed by multiplexed mutation profiling and integrative genomics. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* doi:10.1002/ijc.28750
- Tayama, M., Furuhashi, T., Inafuku, Y., Okita, K., Nishidate, T., Mizuguchi, T., Kimura, Y., Hirata, K., 2011. Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 17, 4867–4874. doi:10.3748/wjg.v17.i44.4867
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., Abraham, J.A., 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947–11954.
- Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groenigen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O, Punt CJ. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. 2009. *N Engl J Med.* 360(6):563-72. doi: 10.1056/NEJMoa0808268.
- Tozer, G.M., Kanthou, C., Baguley, B.C., 2005. Disrupting tumour blood vessels. *Nat. Rev. Cancer* 5, 423–435. doi:10.1038/nrc1628
- Tozer, G.M., Kanthou, C., Lewis, G., Prise, V.E., Vojnovic, B., Hill, S.A., 2008. Tumour vascular disrupting agents: combating treatment resistance. *Br. J. Radiol.* 81 Spec No 1, S12–20. doi:10.1259/bjr/36205483
- Travis, W.D., Brambilla, E., Riely, G.J., 2013. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 992–1001. doi:10.1200/JCO.2012.46.9270

- Tsuchida, R., Osawa, T., Wang, F., Nishii, R., Das, B., Tsuchida, S., Muramatsu, M., Takahashi, T., Inoue, T., Wada, Y., Minami, T., Yuasa, Y., Shibuya, M., 2013. BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2013.358
- Tugues, S., Honjo, S., König, C., Padhan, N., Kroon, J., Gualandi, L., Li, X., Barkefors, I., Thijssen, V.L., Griffioen, A.W., Claesson-Welsh, L., 2013. Tetraspanin CD63 promotes vascular endothelial growth factor receptor 2- β 1 integrin complex formation, thereby regulating activation and downstream signaling in endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 288, 19060–19071. doi:10.1074/jbc.M113.468199

U

- Ulivi, P., Zoli, W., Capelli, L., Chiadini, E., Calistri, D., Amadori, D., 2013. Target therapy in NSCLC patients: Relevant clinical agents and tumour molecular characterisation. *Mol. Clin. Oncol.* 1, 575–581. doi:10.3892/mco.2013.100

V

- Vacca, A., Scavelli, C., Serini, G., Di Pietro, G., Cirulli, T., Merchionne, F., Ribatti, D., Bussolino, F., Guidolin, D., Piaggio, G., Bacigalupo, A., Dammacco, F., 2006. Loss of inhibitory semaphorin 3A (SEMA3A) autocrine loops in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Blood* 108, 1661–1667. doi:10.1182/blood-2006-04-014563
- Valdembri, D., Caswell, P.T., Anderson, K.I., Schwarz, J.P., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J.C., Humphries, M.J., Bussolino, F., Serini, G., 2009. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates α 5 β 1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* 7, e25. doi:10.1371/journal.pbio.1000025
- Van Cutsem, E., de Haas, S., Kang, Y.-K., Ohtsu, A., Tebbutt, N.C., Ming Xu, J., Peng Yong, W., Langer, B., Delmar, P., Scherer, S.J., Shah, M.A., 2012a. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 2119–2127. doi:10.1200/JCO.2011.39.9824
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C., 2012b. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3499–3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
- Van der Veldt, A.A.M., Lubberink, M., Bahce, I., Walraven, M., de Boer, M.P., Greuter, H.N.J.M., Hendrikse, N.H., Eriksson, J., Windhorst, A.D., Postmus, P.E., Verheul, H.M., Serné, E.H., Lammertsma, A.A., Smit, E.F., 2012. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell* 21, 82–91. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.023
- Van Heeckeren, W.J., Ortiz, J., Cooney, M.M., Remick, S.C., 2007. Hypertension, proteinuria, and antagonism of vascular endothelial growth factor signaling: clinical toxicity, therapeutic target, or novel biomarker? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 2993–2995. doi:10.1200/JCO.2007.11.5113
- Varey, A.H.R., Rennel, E.S., Qiu, Y., Bevan, H.S., Perrin, R.M., Raffy, S., Dixon, A.R., Paraskeva, C., Zaccaro, O., Hassan, A.B., Harper, S.J., Bates, D.O., 2008. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental

- colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br. J. Cancer* 98, 1366–1379. doi:10.1038/sj.bjc.6604308
- Varner, J.A., Brooks, P.C., Cheresh, D.A., 1995. REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes. Commun.* 3, 367–374.
- Vempati, P., Popel, A.S., Mac Gabhann, F., 2011. Formation of VEGF isoform-specific spatial distributions governing angiogenesis: computational analysis. *BMC Syst. Biol.* 5, 59. doi:10.1186/1752-0509-5-59
- Vermeulen, P.B., van Golen, K.L., Dirix, L.Y., 2010. Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge. *Cancer* 116, 2748–2754. doi:10.1002/cncr.25169
- Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, Rak J, Kerbel RS. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. 2001. *Cancer Res.* 61(13):5090-101.
- Villegas, G., Lange-Sperandio, B., Tufro, A., 2005. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 67, 449–457. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67101.x
- Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., Persico, G., 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93, 1493–1495.
- Vintonenko, N., Pelaez-Garavito, I., Buteau-Lozano, H., Toullec, A., Lidereau, R., Perret, G.Y., Bieche, I., Perrot-Appianat, M., 2011. Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions. *Cell Adhes. Migr.* 5, 332–343. doi:10.4161/cam.5.4.17287

W

- Wakui, S., Furusato, M., Itoh, T., Sasaki, H., Akiyama, A., Kinoshita, I., Asano, K., Tokuda, T., Aizawa, S., Ushigome, S., 1992. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J. Pathol.* 168, 257–262. doi:10.1002/path.1711680303
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H., 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269, 26988–26995.
- Wanami, L.S., Chen, H.-Y., Peiró, S., García de Herreros, A., Bachelder, R.E., 2008. Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Exp. Cell Res.* 314, 2448–2453. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.004
- Wang, J., Guo, Y., Wang, B., Bi, J., Li, K., Liang, X., Chu, H., Jiang, H., 2012. Lymphatic microvessel density and vascular endothelial growth factor-C and -D as prognostic factors in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Mol. Biol. Rep.* 39, 11153–11165. doi:10.1007/s11033-012-2024-y
- Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S., Mukhopadhyay, D., 2003. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 278, 48848–48860. doi:10.1074/jbc.M310047200
- Wang, R., Crystal, R.G., Hackett, N.R., 2009. Identification of an exonic splicing silencer in exon 6A of the human VEGF gene. *BMC Mol. Biol.* 10, 103. doi:10.1186/1471-2199-10-103
- Wedge SR, Ogilvie DJ., Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF. ZD6474 inhibits vascular

- endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. 2002. *Cancer Res.* 62(16):4645-55.
- Weis, S.M., Cheresh, D.A., 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* 17, 1359–1370. doi:10.1038/nm.2537
- Welford, A.F., Biziato, D., Coffelt, S.B., Nucera, S., Fisher, M., Pucci, F., Di Serio, C., Naldini, L., De Palma, M., Tozer, G.M., Lewis, C.E., 2011. TIE2-expressing macrophages limit the therapeutic efficacy of the vascular-disrupting agent combretastatin A4 phosphate in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1969–1973. doi:10.1172/JCI44562
- West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., Ron, D., Fernig, D.G., 2005. Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* 280, 13457–13464. doi:10.1074/jbc.M410924200
- Wild, J.R.L., Staton, C.A., Chapple, K., Corfe, B.M., 2012. Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 81–103. doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00810.x
- Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y., Jain, R.K., 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* 10, 145–147. doi:10.1038/nm988
- Willett, C.G., Duda, D.G., di Tomaso, E., Boucher, Y., Ancukiewicz, M., Sahani, D.V., Lahdenranta, J., Chung, D.C., Fischman, A.J., Lauwers, G.Y., Shellito, P., Czitö, B.G., Wong, T.Z., Paulson, E., Poleski, M., Vujaskovic, Z., Bentley, R., Chen, H.X., Clark, J.W., Jain, R.K., 2009. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3020–3026. doi:10.1200/JCO.2008.21.1771
- Williams, M.D., Sandler, A.B., 2001. The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat. Res.* 105, 31–52.
- Wistuba, I.I., 2012. Molecular Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Carcinomas. *J. Lung Cancer* 11, 12. doi:10.6058/jlc.2012.11.1.12
- Wistuba, I.I., Berry, J., Behrens, C., Maitra, A., Shivapurkar, N., Milchgrub, S., Mackay, B., Minna, J.D., Gazdar, A.F., 2000. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 2604–2610.
- Wittko-Schneider, I.M., Schneider, F.T., Plate, K.H., 2013. Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2—two unequal brothers in mind. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1705–1725. doi:10.1007/s00018-013-1279-3
- Woolard, J., Bevan, H.S., Harper, S.J., Bates, D.O., 2009. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirc. N. Y. N* 1994 16, 572–592. doi:10.1080/10739680902997333
- Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.-G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J.D., Whittles, C.E., Mushens, R.E., Gillatt, D.A., Ziche, M., Harper, S.J., Bates, D.O., 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 64, 7822–7835. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0934
- Wu, J.M., Staton, C.A., 2012. Anti-angiogenic drug discovery: lessons from the past and thoughts for the future. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 723–743. doi:10.1517/17460441.2012.695774
- Wu, X.-Y., Ma, W., Gurung, K., Guo, C.-H., 2013. Mechanisms of tumor resistance to small-molecule vascular disrupting agents: treatment and rationale of combination therapy. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 112, 115–124. doi:10.1016/j.jfma.2012.09.017

X

- Xie, Q., Vande Woude, G.F., Berens, M.E., 2012. RTK inhibition: looking for the right pathways toward a miracle. *Future Oncol. Lond. Engl.* 8, 1397–1400. doi:10.2217/fon.12.130
- Xu, J., Dou, T., Liu, C., Fu, M., Huang, Y., Gu, S., Zhou, Y., Xie, Y., 2011. The evolution of alternative splicing exons in vascular endothelial growth factor A. *Gene* 487, 143–150. doi:10.1016/j.gene.2011.06.024

Y

- Yacoub, M., Coulon, A., Celhay, O., Irani, J., Cussenot, O., Fromont, G., 2009. Differential expression of the semaphorin 3A pathway in prostatic cancer. *Histopathology* 55, 392–398. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03406.x
- Yamaguchi, S., Iwata, K., Shibuya, M., 2002. Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 554–559. doi:10.1006/bbrc.2002.6478
- Yang, Y., Yuzawa, S., Schlessinger, J., 2008. Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7681–7686. doi:10.1073/pnas.0802896105
- Yasuoka, H., Kodama, R., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Akamatsu, H., Nakahara, M., Inagaki, M., Sanke, T., Nakamura, Y., 2009. Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 9, 220. doi:10.1186/1471-2407-9-220
- Yuan, A., Lin, C.-Y., Chou, C.-H., Shih, C.-M., Chen, C.-Y., Cheng, H.-W., Chen, Y.-F., Chen, J.J.W., Chen, J.-H., Yang, P.-C., Chang, C., 2011. Functional and structural characteristics of tumor angiogenesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-MRI. *PloS One* 6, e16062. doi:10.1371/journal.pone.0016062
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Bréant, C., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Eichmann, A., 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4797–4806.

Z

- Zarogoulidis, K., Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Boutsikou, E., Machairiotis, N., Tsakiridis, K., Katsikogiannis, N., Kougioumtzi, I., Karapantzios, I., Huang, H., Spyrtatos, D., 2013. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Thorac. Dis.* 5, S389–S396. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.10
- Zavadil, J., Böttinger, E.P., 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–5774. doi:10.1038/sj.onc.1208927
- Zecchin, A., Pattarini, L., Gutierrez, M.I., Mano, M., Mai, A., Valente, S., Myers, M.P., Pantano, S., Giacca, M., 2014. Reversible acetylation regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 activity. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 116–127. doi:10.1093/jmcb/mju010

- Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R.S., Schipani, E., Olsen, B.R., 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 2161–2171. doi:10.1242/dev.01053
- Zhang, F., Tang, Z., Hou, X., Lennartsson, J., Li, Y., Koch, A.W., Scotney, P., Lee, C., Arjunan, P., Dong, L., Kumar, A., Rissanen, T.T., Wang, B., Nagai, N., Fons, P., Fariss, R., Zhang, Y., Wawrousek, E., Tansey, G., Raber, J., Fong, G.-H., Ding, H., Greenberg, D.A., Becker, K.G., Herbert, J.-M., Nash, A., Yla-Herttuala, S., Cao, Y., Watts, R.J., Li, X., 2009. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6152–6157. doi:10.1073/pnas.0813061106
- Zhang, T., Kruys, V., Huez, G., Gueydan, C., 2002. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 952–958. doi:10.1042/
- Zhang, Y., He, J., 2013. The development of targeted therapy in small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 5, 538–548. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.04
- Zhao, M., Shi, X., Liang, J., Miao, Y., Xie, W., Zhang, Y., Li, X., 2011. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Exp. Eye Res.* 93, 921–926. doi:10.1016/j.exer.2011.10.013
- Zygalaki, E., Kaklamanis, L., Nikolaou, N.I., Kyrzopoulos, S., Houri, M., Kyriakides, Z., Lianidou, E.S., Kremastinos, D.T., 2008. Expression profile of total VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clin. Biochem.* 41, 82–87. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.09.005
- Zygalaki, E., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Lianidou, E.S., 2007. Quantitative real-time reverse transcription PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non small cell lung cancer. *Clin. Chem.* 53, 1433–1439. doi:10.1373/clinchem.2007.086819

ANNEXES

ANNEXE 1

**Low glucose microenvironment of normal kidney cells stabilizes
a subset of messengers involved in angiogenesis, including
VEGFA and HIF1A**

Elodie de Laplanche^{1,2,3,4}, Asma Boudria^{5,§}, Estelle Dacheux^{1,2,3,4,§}, Anne Vincent^{1,2,3,4},
Nicolas Gadot^{1,2,3,4,6}, Fouzia Assade^{1,2,3,4}, Katy Le Corff^{1,2,3,4}, Xavier Leroy⁷, Florence Mège
Lechevallier⁶, Béatrice Eymin⁵, Nicole Dalla Venezia^{1,2,3,4} and Hélène Simonnet^{1,2,3,4,*}

¹Université de Lyon, Lyon F-69000, France; ²Université Lyon 1, Lyon F-69000, France ;
³Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon F-69000, France ;
⁴CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon F-69000, France ;
⁵Institut Albert Bonniot Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du
Poumon, INSERM U823/Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000 France ;
⁶Department of Pathology, Hôpital Edouard Herriot, Lyon F-69000, France ; ⁷Institut de
Pathologie, CHRU, Faculté de Médecine, Université de Lille, F-59000, France

§ AB and ED contributed equally to this work.

Running title: Low glucose microenvironment and angiogenic mRNAs

***Corresponding author:**

Hélène Simonnet, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Lyon
1/INSERM U 1052/CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, 28, rue Laënnec, F-69008 Lyon.
E-mail: helene.simonnet@lyon.unicancer.fr
Phone: (33) 469 16 66 12, fax: (33) 469 16 66 60

ABSTRACT

Since glucose is a mandatory nutrient for cell proliferation and renewal it is suspected that glucose microenvironment is sensed by all cell types to regulate angiogenesis. Several glucose-sensing components have been partially described. All mainly respond to high glucose levels, however little is known about the response to low glucose. Here we used well-differentiated isolated normal rat renal tubules under normal oxygenation conditions to assess the angiogenic response to low glucose. In apparent paradox, but confirming observations made separately in other models, high glucose but also low glucose increased mRNA level of VEGFA. A subset of mRNAs such as FLK1, TIE-2, GLUT1, ALDOA, HIF1A and HIF2A were similarly glucose-sensitive. VEGFA and GLUT1 proteins responded shortly later, showing that VEGFA can be regulated by glucose in spite of normal oxygenation, and suggesting that normal tissue may participate in angiogenesis in the tumor environment. mRNAs responded to low glucose by increased stability and independently of HIF1A and HIF2A proteins. VEGFA mRNA has been described as stabilized by the RNA-binding (Poly(A)-Binding Protein) Interacting Protein PAIP2, known to allow translation of IRES-containing mRNAs. We further show that PAIP2 binds VEGFA and HIF1A mRNAs, which contain an IRES, that PAIP2 is glucose-sensitive, and that it is well-expressed in the cytoplasm of normal tubular cells surrounding tumors, suggesting that it might play a role in low glucose sensing.

Keywords: metabolism, glucose sensing, cancer, diabetes

Abbreviations: VEGF/VPF: Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGFA, vegfa); VHL: protein product of the von Hippel-Lindau gene (VHL, vhl); HIF: Hypoxia-Inducible Factor, genes HIF1A (HIF1 α , Hif1a), HIF2A (HIF2 α , Hif2a), HIF3A (HIF3 α , Hif3a); FLK1/VEGFR2: VEGF receptor 2 (also KDR, Kdr); TIE2: angiopoietin receptor (also TEK, Tek), GLUT 1: glucose facilitated transporter 1 (SLC2A1, Slc2a1); PAIP2: poly(A) binding protein interacting protein 2 (PAIP2, Paip2). IRES: Internal Ribosome Entry Site.

INTRODUCTION

Since glucose is a mandatory nutrient for cell proliferation and renewal [1], it is suspected that glucose microenvironment is sensed by all cell types in order to regulate the pathways involved in these functions. Furthermore, as many cancer cells take up glucose with avidity and depend on this nutrient for their growth [2,3] in combination with using little or no oxygen, it has long been pointed that neoangiogenesis serves the purpose of providing glucose rather than oxygen in tumors. Several glucose sensing components have been partially described in different cell types, such as O-glycosylation of regulatory proteins [4], glucose sensing at the membrane level by GLUT2 [5], the AMPK/mTOR-dependent protein synthesis [6], and in liver the CHREBP/MONDOB transcription factor [7]. All of these respond mainly to high glucose levels, however little is known as to whether and how low glucose can induce a response to restore nutrient supply. Yet, as early as 1995, the group of Keshet had shown that the VEGFA/VPF (Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor) is up regulated by low glucose (increased by shortage) in glial cell spheroids considered as stem cells, both at the mRNA level and at the protein level, through mRNA stabilization [8,9]. In apparent contrast, in other organs such as kidney tubule and retina, it is high glucose that has been mentioned to increase VEGFA transcript and protein levels [10,11,12] (increased by abundance), and, in kidney tubule, hyperglycemia favors hypertrophy [13]. To date, the response of other angiogenic factors to low glucose remains unknown.

The main known regulator of angiogenesis and energy metabolism in normal cells is the Hypoxia-Inducible Factor, HIF [14]. HIF binding to DNA induces the transcription of at least one hundred mRNAs involved in neoangiogenesis (VEGFA, PDGF, FLK1/VEGFR2, TIE2, the angiopoietin receptor...), in glycolysis (GLUT1, AldoA...) in extracellular matrix remodeling and in survival [15]. VEGFA and its main receptor VEGFR2/FLK1/KDR are themselves involved in several other cell functions including vascular permeability, cell division and survival, endothelium budding, but also endothelial cell migration [16]. Moreover, it is now recognized that VEGF receptors, once believed to be restricted to endothelial cells, are expressed more widely [16]. Their regulator HIF contains two subunits, HIFA and HIFB, the former being sensitive to oxygen pressure at the level of its protein stability and of its transcriptional activity. Under normal oxygen content, HIFA is hydroxylated in its oxygen-dependent domain (ODD) by a HIF-prolyl hydroxylase [17]. The hydroxylated proline is recognized by the tumor suppressor VHL [18], causing HIF ubiquitination and hence its degradation by the proteasome [19]. Under low oxygen or when VHL is defective such as in clear cell renal carcinoma, HIFA protein is stable [20] and forms with its partner HIFB a dimer that binds DNA on the Hypoxia Response Elements (HREs). Under intermediate oxygen levels, another dioxygenase/hydroxylase, FIH, hydroxylates an asparagine residue in the C-terminal region termed C-transactivating domain (CTAD), and decreases HIFA interaction with its cofactor P300/CBP, and its binding to DNA [21]. Three

isoforms of the regulated HIF α subunit have been described, each being encoded by a separate gene. HIF1 α and HIF2 α mRNAs are expressed in all organs tested, including the kidney [22]. The HIF2 protein presents good structural and functional homologies with HIF1 α and is also down regulated by VHL, yet its roles and targets are different in some aspects [23]. The most striking difference is that HIF2 is an oncogene whereas HIF1 is a survival factor that decreases growth probably due to their different interactions with other proteins such as cMYC partners and eIF4E2 [23,24], but also with other members of their own family [25]. Regulation of HIF3 α is less documented. This protein has also been found in kidney, and several splicing variants have been described [22,25]. HIF3 α protein expression is generally considered as inhibitory to the function of the other family members [26,27]. Finally, the less well-known field of HIF α biology is the regulation of its messengers. Studies in tumor cells show that HIF1 α and HIF2 α mRNA levels are not regulated by oxygen [20,22], however it is not known whether they are sensitive to other nutrients.

In this study, we decided to further investigate how normal, non transformed cells can respond to glucose shortage by restoring glucose supply. To this end, we took advantage of an *ex vivo* model of isolated renal cortical tubules with normal oxygenation in which glucose concentrations were controlled. We analyzed the physiological response of angiogenesis factors to low glucose, and we investigated whether HIF α proteins or mRNAs are involved in this response. The results showed that low glucose in the microenvironment of normal kidney cells increases a series of mRNAs involved in angiogenesis including VEGFA, HIF1 α and HIF2 α themselves. VEGFA protein was up regulated and its mRNA was stabilized under low glucose in the presence of oxygen independently of HIF1 α protein. Furthermore, the data revealed that HIF1 α mRNA interacts with the RNA-binding protein PAIP2 (PolyA-Binding Protein Interacting Protein 2) and that this interaction increases under low glucose, thereby suggesting a novel mode of glucose sensing.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Statement

The study was carried out in strict accordance with the recommendations of the French National Ethics Committee. The protocol was approved by the Comité d'Ethique en Experimentation Animale (CE2A) of the University Claude Bernard Lyon 1 (agreements UCBL1 n°BH2007-07 and n°DR2013-02). Animals were deeply anaesthetized by a lethal injection of pentobarbital before kidneys were removed.

Preparation and incubation of isolated rat renal tubule suspensions

Renal cortical tubule suspensions were isolated by collagenase digestion from pooled kidney cortices of 4 male Sprague-Dawley rats (Charles River, Les Oncins, France), as previously described [28]. They were incubated in DMEM/F12 medium containing 25 mM bicarbonate, 10 mM HEPES at pH 7.4, 5 mM glucose (control condition), 0.5 mM lactate, 4 mM glutamine

and 20 mg/l egg-white lysozyme as an antibacterial agent, in stoppered flasks equilibrated with 95% air/ 5% CO₂ and shaken at 37°C under variable protein concentrations and variable incubation volumes as described previously [28] to achieve reproducible normoxia or hypoxia. At the end of the incubation time, pO₂, pCO₂ and pH of the liquid phase were measured with a gas analyzer (Radiometer ABL5) and the remaining suspension was centrifuged. After 4 hours mean final value of pO₂ was 42±4 mm Hg in the medium, pCO₂ 45±5 mmHg, pH 7.37±0.02 and glucose 5.0 ±1.3 (data from 4 experiments). All final pO₂ values in liquid phase are reported in Figure 3A. The pelleted tubules were stored at -80°C for RNA extraction or for protein analysis. The supernatants aliquots were immediately stored at -80°C for protein determination or deproteinized and stored at -20°C for further glucose and lactate determinations.

RNA analyses

Transcripts relative abundances were determined as previously described [28]. Briefly, total RNA was extracted with Trizol® reagent (Invitrogen, France) and double stranded cDNAs synthesized. Real-time or semi-quantitative RT-PCR was performed and the values normalized to that of the ribosomal protein encoding L32, which is not a HIF target. Primer sequences and elongation temperatures were as follows: HIF1A, (region which is not complementary to aHIF), FOR (A1): GGACAAGTCACCACAGGACA, REV (A2): GGAGAAAATCAAGTCGTGCTG, 65°C, HIF2A, FOR: GCGACAATGACAGCTGACAAGG, REV: GTCCCATGAACTTGCTGATGTTT, 66°C, VEGF A, 188 variant, FOR: CCCGGTTTAAATCCTGGTGGAGCG, REV: CGCCTTGGCTTGTCACATCTGC, 66°C, TIE-2, FOR: ATGGACTCTTTAGCCGGCTTA, REV: CCTTATAGCCTGTCCTCGAA, 56°C, FLK1, FOR: GCAAGAGCAGAGACACTCTTC, REV: CTGGCATCATAAGGCAAGCG, 56°C, GLUT1, FOR: CAGGCTCCATTTAGGATTCGCC, REV: CTCAGCCTCCGAGGTCCTTCTC, 64°C, Aldolase A, FOR: CAGGAAGCATTGCCAAGCGCC, REV: GACACTGTACCAGAAGGC, 68°C. *Controls.* L32, FOR: GTGAAGCCCAAGATCGTCAA, REV: TTGTTGCACATCAGCAGCAC, 60°C, 18S, FOR: TGAACCCCATTCGTGAT, REV: TACAAAGGGCAGGGACTTA, 53°C.

Measurement of mRNA half-lives

Isolated tubule suspensions were pre-incubated for 2 hours under different glucose concentrations to reach a steady state in mRNA metabolism. Then 50 microM of the polymerase II inhibitor 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-beta-D-ribofuranoside (DRB) were added through the stopper to achieve the maximal transcription inhibition as determined in preliminary experiments. Tubules were pelleted for RNA measurement as above. mRNA contents were normalized to that of 18S ribosomal RNA.

Western blot analyses

After whole tubule pellet lysis with 450 mM NaCl, 50 mM Tris-EDTA pH 8, 10% glycerol,

0.5% NP40 and inhibitors of proteases and phosphatases, VEGF was analyzed by western blotting using the pan-VEGF antibody from Santa Cruz (sc-152) and the anti-VEGF_{xxx}b antibody from ABCAM (ab14994). FLK1, TIE 2, GLUT1, Aldolase A and Tubulin were analyzed by western blotting with antibodies from respectively Cell Signaling (2479), Santa Cruz (sc-9026), ABCAM (ab14683), Cell Signaling (3188) and Calbiochem (CP06). HIF1A, HIF2A and actin (epitope present in the six isoforms of vertebrate actin) were determined in nuclear fraction after tubule lysis [29] by western blotting with antibodies from respectively Santa Cruz Biotechnology Inc (sc-10790), ABCAM (ab8365) and Chemicon (MAB1501) as previously described [30]. HuR, PAIP2 and actin were determined in tubule pellets lysed in Tris-EDTA buffer containing 1% deoxycholate, 0.2% triton X-100, 0.02% SDS, DTT and protease inhibitors. Western blotting was performed with anti- PAIP2 antibody 1/5000 (generous gift from Gilles Pagès, Nice [31]), HuR antibody from Sigma (H1663) and anti actin as above. PAIP2 was detected at a high apparent molecular weight. Similarly, commercially available antibodies also detect PAIP2 at variable sizes in different cell lines, as shown by Proteinech website (www.ptglab.com).

Immunoimmobilization of nucleoprotein complexes.

Frozen tubule pellets were resuspended in lysis buffer containing Tris-HCl pH 7.4, 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X100, 0.1 SDS, 1 U/microL RNasin®, antiprotease mix (Sigma-Aldrich), 10mM NaF, 1mM sodium azide, 10 mM glycerophosphate and passed through a needle. 1 µg PAIP2 antibody or 1 µg non relevant antibody (rabbit IgG from ABCAM ab37415) was added for 2 hours at 4°C. Sepharose protein A beads saturated with 2% Bovine Serum Albumin were added for an additional hour. After extensive washes with lysis buffer, 30% of the beads were extracted with western blotting lysis reagent and subjected to SDS-PAGE and Western blotting, whereas 70% were extracted with Trizol reagent for RNA measurement.

Immunohistochemistry

Tissue samples were obtained from surgical nephrectomy specimens and processed within 1 h following surgical resection. All patients had been informed and consented to the use of their tissues for research purposes. For histological examination, tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. 4 µm-thick tissue sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were prepared according to conventional procedures. Immunohistochemistry was performed on an automated immunostainer (Ventana Benchmark XT, Roche, Meylan, France) using Ultraview Universal DAB Detection Kit according to the manufacturer's instructions. Because of the high endogen content of kidney in biotin, the detection method was devoid of biotin/streptavidin step. Sections were incubated with PAIP2 antibody (1:500) for 32 minutes at 37°C. Staining was visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Finally, the sections were counterstained with Gill's hematoxylin. The stained sections were examined using a Mirax slide scanner (Zeiss).

RESULTS AND DISCUSSION

A particular model used to study the well oxygenated renal cortical tubules *ex vivo*.

The renal cortex which is normally highly vascularized loses its capacity to produce glucose and to use lactate as a substrate when cultured in unstirred conditions [32]. We have previously shown that this is linked mainly to the poor oxygenation of the medium and that the shift from lactate utilization to lactate production occurs rapidly when tubule suspensions are not efficiently shaken in a gas phase of 20% oxygen, in a state where respiration and CO₂ production are not abolished and without any ATP level modification [28]. Using this model, we had previously described transcriptome modifications 4 hours after oxygenation changes: *hypoxia* (which in this model is far from the classical but drastic oxygen deprivation achieved with unstirred cells cultured under 1% oxygen in the gas phase) induced many marked changes in tubule specific mRNAs [28]. In the present work, we used a model of freshly isolated rat kidney tubules, as described in the Material and Methods section, to investigate the metabolic adaptations to glucose microenvironment.

Low glucose increases VEGFA and a subset of mRNAs involved in angiogenesis and glucose consumption.

Tubule suspensions were incubated in the presence of different glucose concentrations and under a mean final pO₂ value of approximately 40 mm Hg, which is normal for this highly oxidative tissue. Modifying glucose levels did not alter pO₂ (not shown). We first investigated the effect of glucose on mRNAs involved in angiogenesis such as those of VEGF A, its main receptor FLK1/VEGFR2 and the angiopoietin receptor TIE-2, and on others involved in glucose uptake (GLUT1) and in glycolysis (aldolase A). As expected, high glucose increased VEGFA mRNA level, confirming previous observations in rat kidney *in vivo* [10,11]. However, VEGFA mRNA level also increased under low glucose, in agreement with the findings of Stein and coworkers in spheroids of glial cells [9], and therefore was less expressed under normal glucose level (Figure 1A). In addition all other mRNA levels of this subset were increased by low glucose (Figures 1A and 1B). Therefore, not only high glucose levels but also low glucose levels are able to increase angiogenic mRNAs in the same cell type. This may be indicative of a narrow window of regulation.

Low glucose also increases VEGFA and GLUT1 protein levels.

VEGFA gene is transcribed into several splicing variants. The alternative variants containing the 8b exon are termed xxxb (xxx for the size of the protein in number of aminoacids) [33]. The xxxb proteins have been shown to display poor angiogenic capacities but are highly expressed in normal kidney tissue [33,34]. We therefore analyzed VEGFA protein expression in both intra-cellular extracts and supernatants of renal tubules, using either an antibody directed against all isoforms (pan-VEGF) or against the anti-angiogenic isoforms (VEGF_{165b}). Both protein isoforms were present, and responded to glucose in parallel with

those of the VEGF mRNA (Figure 2A). The protein changes appeared only after 7 hours of incubation, either as intracellular changes of protein expression or as secreted proteins as shown in Figure 2A. There was no significant difference between pro and anti-angiogenic isoforms in their response to glucose.

GLUT1 protein was slightly sensitive to glucose after 7hrs (Figure 2B) whereas no change could be detected in aldolase A. This can be explained by the very long half- life of aldolase A protein (one to several days [35]). The variation of TIE-2 protein, which has a half-life of 7 hrs [36], was hardly detectable (Figure 2B). Variations in FLK1 levels should have been detected since its protein half-life is one hour or less [37], however Figure 2B shows no variations. Adham and Coomber [38] have also shown in endothelial cells that glucose lowering to 2 mM does not alter FLK1 protein level or decreases it, whereas in the meantime its transcript level is increased. They found that this is a counter regulation possibly due to an unfolded protein response (UPR), due to the glycosylation defect that appears when glucose supply is dramatically lowered. The UPR response is generally observed when glucose supply does not meet the cell demand, typically in growing cells, but also under hypoxia. Under these conditions of deprivation, a general decrease of translation is observed, except for a subset of transcripts such as those of HIF1A and VEGFA [39,40], and an apoptotic process may ensue, driven by the UPR machinery [41]. Bouvier and coll. had already shown in unstirred transformed renal tubular cells that total deprivation of glucose increases VEGFA mRNA and protein in transformed renal tubular cells [42]. Under these conditions however, GLUT1 mRNA did not change, and the response to high glucose levels was lost.

HIF1A and HIF2A mRNA levels are not correlated with oxygen concentration, but respond to glucose in parallel with those of angiogenic mRNAs.

We then searched for mRNA variations of the main regulator of angiogenesis, HIF, focusing on the regulated subunits HIF1A and HIF2A. Experiments were performed under different conditions of oxygenation and different glucose concentrations. Final pO₂ in liquid phase was determined in parallel with final glucose content in each flask and final values are reported in Figure 3A. The results show that HIF1A or HIF2A mRNA levels were not correlated with pO₂ values, in spite of large variations (Figures 3A and 3B). This is in agreement with previous studies in renal cancer cell lines and in normal kidney tissue [20,22]. However HIF1A mRNA levels closely covaried with glucose levels, as well as HIF2A mRNA (Figure 3A, bottom), in parallel with those of the angiogenic and glycolytic mRNAs depicted in Figure 1. The lowest concentration of glucose yielded irregular results, with a fall in mRNA levels when the final concentration fell below a limit estimated at 0.5 mM glucose (not shown). This fall of HIF1A expression under subtotal absence of glucose had already been observed [43]. Above this threshold, there was a clear cut covariation between HIF1A transcript and glucose final content (Figure 3A, bottom). Glucose content as low as 3mM markedly increased intracellular HIF1A transcript level when compared to the reduced level at 5mM glucose. High glucose concentrations of 7-8 mM and up to values frequently reached in diabetes again increased HIF1A transcript level. The response of HIF2A mRNA paralleled the response of HIF1A

(Figure 3B).

Our results could explain the observation made in another study [44], showing a paradoxical decrease of HIF1A mRNA level and stability after 12 hours of drastic hypoxia. In these tumoral cells cultured under 20 mM glucose, hypoxia could have induced a change in glucose content toward normality. In support of this hypothesis, Thomas et al. have shown that HIF1A mRNA decrease was linked to the decrease of high glucose concentration toward normal throughout a period of hypoxia [40]. Taken together, these results clearly demonstrate that HIF1A transcript is not constitutively expressed but tightly regulated by one of the main nutrients, glucose, and notably increased by its shortage. When physiopathological conditions stabilize HIF1A proteins, this is prone to amplify its effects. However, in this work, which is performed under normal oxygenation, HIF1A proteins are absent and their target mRNAs are regulated independently of HIF (see below).

VEGFA mRNA changes under low and high glucose are HIF-independent.

Since VEGFA, FLK1, TIE-2, GLUT1 and ALDO1 genes are targets of the HIF1A and HIF2A transcription factors, we checked for the presence of HIF1A and HIF2A proteins. However no significant amount of HIF1A or HIF2A protein was detected under any glucose concentration in these normal cells (Figure 4). Several authors had already reported that HIF1A proteins are inconsistently or hardly detectable in normal kidney cortex *in vivo* [22,29,45,46]. This is probably due to oxygen-sensitive degradation since HIF1A is detected in the less vascularized medulla zone of the kidney [29]. Therefore in this work VEGF mRNA changes were essentially HIF- independent. In the above cited work of Bouvier and coll., VEGFA was also increased by total glucose deprivation in the absence of HIF1A protein [42]. In their study, when in addition HIF was stabilized by deep oxygen exhaustion, the effect of low glucose on VEGFA transcript was amplified [42].

Our results confirm that VEGFA protein can be expressed in oxygenated, respiring, normal cells, as observed in cortical biopsies of tumor-bearing kidneys [33,34]. More important, the study shows that, under normal oxygenation conditions, VEGFA expression is up regulated by shortage of glucose.

Low glucose increases half-lives of HIF1A, VEGFA and other HIF target mRNAs.

Next, to understand whether the changes in VEGFA transcript level were due to stabilization, overall transcription was inhibited with 5,6- Dichlorobenzimidazole 1-beta-D-ribofuranoside (DRB). The resulting mRNA decays are shown in Figure 5. HIF1A mRNA half-life was approximately 25 minutes under normal glucose levels, but lengthened twofold after lowering glucose concentration to 3 mM or after increasing it to 18 mM. VEGFA transcripts, together with those of TIE-2 and FLK1, exhibited a logarithmic decrease under normal glucose, with a rapid component and a slower component, suggesting two different mechanisms of decay. Glucose variations affected essentially the rapid component, so that VEGFA mRNA half-life lengthened from 12 minutes under normal glucose to 35 minutes under low glucose and to 60 minutes under high glucose. The same type of response was obtained with FLK1 and TIE-2,

but not with the mRNA encoding L32 ribosomal protein (Figure 5). Interestingly, in a study of mRNAs to which ribosomes are bound under hypoxia, L32 was shown to belong to the mRNA subset that is less translated [39]. On the contrary, under this condition HIF1 and VEGFA mRNAs continued to be translated [39]. In intermediate conclusion, our results show that glucose variations, and more strikingly low glucose microenvironment, stabilize HIF1A mRNA as well as some of its transcriptional targets.

Low glucose regulates HIF1A mRNA interaction to the RNA-binding protein PAIP2.

PAIP2 is sometimes considered as a down-regulating protein since it decreases cap-dependent, non IRES-dependent translation that is regulated by mTOR [47]. However, PAIP2 is also able to bind some IRES-containing transcripts such as those of virally-induced proteins thereby not altering translation [48]. IRES have been identified in TIE-2 [49], HIF1A [50] and VEGFA mRNAs [51], and several lines of evidence showed that at least for VEGFA and HIF1A, these IRES are used for their maintained translation under ischemic conditions [52,53]. Moreover, it has been previously shown that VEGFA mRNA is stabilized through its association with PAIP2 [31] and that the RNA-binding protein HuR, together with PAIP2, also increases VEGFA mRNA stability [31,54]. Based on these data and our findings demonstrating that VEGFA mRNA was stabilized under low or high glucose condition (Figure 5), we postulated that PAIP2 and/or HuR protein play a role in this setting. First, we analyzed the expression level of both proteins in response to glucose. In our cellular model, endogenous PAIP2 protein level increased in response to low or high glucose condition (Figure 6A), thereby exhibiting the same variations than VEGFA and HIF1A mRNAs (Figures 1 and 3). By contrast, in the same conditions, HuR protein level did not vary. To go further, we undertook to test the consequences of PAIP2 knock-down on VEGFA mRNA half life under low glucose condition in our freshly isolated tubules. Unfortunately, this experimental model was not suitable for such experiment as it was not possible to maintain shaken suspensions of tubule during 72 hours, the time required for efficient invalidation of PAIP2 by siRNA. Of note, we also tried to perform similar experiments in the transformed but not tumoral epithelial kidney rat NRK52 cell line which is easy to transfect. As expected, PAIP2 was well knocked-down in these cells but they did not respond to low glucose and therefore could not be used (Figure S1).

As mentioned above, PAIP2 has been shown to bind VEGFA mRNA but whether it also binds HIF1A mRNA is not known. Thus, to test whether PAIP2 could bind VEGFA and/or HIF1A mRNAs in our experimental model, as well as to investigate whether glucose could interfere on this binding, we performed co-immunoprecipitation of PAIP2-bound mRNAs. After incubation under various glucose concentrations, tubules were lysed and the PAIP2-bound compounds were immuno-immobilized on protein A beads in the presence of anti-PAIP2 antibody. An irrelevant IgG antibody was used as a negative control. Of note, it was hard to efficiently immunoprecipitate endogenous PAIP2 in this model, that might explain, at least in part, why the amount of immobilized PAIP2 appeared unchanged by glucose levels

(Figure 6B, upper panel). Nevertheless, whatever the glucose concentration and in three independent experiments, we observed that VEGFA mRNA as expected, but also HIF1A mRNA, preferentially associated to PAIP2-enriched beads as compared to control IgG beads (Figure 6B, lower panel and Figure S2). More interestingly, the amount of immobilized HIF1A mRNA was reproducibly increased under low glucose (Figure 6B and Figure S2). The fact that HIF1A mRNA was differentially bound to PAIP2 while similar quantities of PAIP2 were immunoprecipitated under all conditions suggests the existence of a yet unknown partner which may vary with glucose level. Inversely, the amount of co-immunoprecipitated VEGFA mRNA less clearly varied in response to high or low glucose concentration (Figure 6B and Figure S2). VEGFA mRNA stability has been shown to be increased by the RNA-binding protein HuR, in interaction with the PAIP2 [31,54]. As HuR protein level did not change under either concentration of glucose in our cellular model (Figure 6A), this might account for this observation. Of note, in similar conditions, very few mRNA encoding L32 could be detected (around $5 \cdot 10^{-10}$ arbitrary units) both on control beads and on immobilized PAIP2, whatever the glucose level. Accordingly, mRNA L32 has been shown to be less translated under hypoxia [39] and the present study showed that its mRNA is not sensitive to glucose (Figure 5). Altogether, these experiments demonstrated that PAIP2 interacts with VEGFA and HIF1A mRNAs in normal kidney tubules, thereby suggesting that this binding controls VEGFA and HIF1A mRNAs metabolism in these cells, notably in response to low glucose.

Because PAIP2 itself appears regulated by glucose, we further propose that it might be a player in the sensitivity of angiogenic factors to microenvironmental glucose variations. However, additional experiments are clearly needed to deepen the role of PAIP2 in this setting. Of note, we started to analyze the expression of PAIP2 *in situ* in clear cell renal carcinomas (also called conventional nephrocarcinomas), the most frequent renal tumors. Our results from sections of 3 low grade tumoral tissues including their margin showed that PAIP2 is almost exclusively cytoplasmic in normal tubules (Figures 7A lower right and 7B), as well as in normal tubules embedded in the unstained fibrous tissue surrounding the tumor (Figure 7C left). By contrast, PAIP2 cytoplasmic staining strongly decreased in tumor cells, with some tumors exhibiting PAIP2 nuclear staining (Figures 7A upper right and 7C right). Therefore, based on the data we obtained in normal kidney tubules, it is tempting to speculate that the sensing of glucose might be altered in these tumors as a consequence of PAIP2 downregulation and/or mislocalization.

In summary, this work demonstrates for the first time that in normal, non-transformed renal tubule, 1) glucose shortage increases VEGFA mRNA and protein levels in spite of high oxygen supply, 2) glucose shortage up-regulates a subset of messengers involved in angiogenesis, including HIF1A and HIF2A mRNAs themselves, independently of HIF proteins, 3) this subset is regulated by mRNA stabilization, 4) PAIP2 protein is sensitive to glucose and binds both HIF1A and VEGFA mRNAs, 5) cytoplasmic staining of PAIP2 is higher in normal renal tubules than in clear cell renal carcinoma.

Acknowledgements. Thanks are due to Catherine Godinot, Eric Clottes, Marc Billaud, Jean-Yves Scoazec, Gilles Pagès and David Bernard for helpful discussions, to Laurent Bezin for kind supply of rat hippocampus tissues, to Gilles Pagès for kind gift of PAIP2 antibody. We gratefully acknowledge Abdallah Gharib for his participation in animal experiments, Jocelyne Demont for skillful technical assistance and David Cox for careful reading of the manuscript.

References

1. Locasale JW, Cantley LC (2011) Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab* 14: 443-451.
2. Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R (1998) Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch Med Res* 29: 1-12.
3. Ortega AD, Sanchez-Arago M, Giner-Sanchez D, Sanchez-Cenizo L, Willers I, et al. (2009) Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett* 276: 125-135.
4. Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800: 96-106.
5. Stolarczyk E, Le Gall M, Even P, Houllier A, Serradas P, et al. (2007) Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice. *PLoS One* 2: e1288.
6. Lee HJ, Mariappan MM, Feliars D, Cavaglieri RC, Sataranatarajan K, et al. (2012) Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 287: 4451-4461.
7. Havula E, Hietakangas V (2012) Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors. *Semin Cell Dev Biol* 23: 640-647.
8. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 768-772.
9. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E (1995) Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15: 5363-5368.
10. Braun L, Kardon T, Reisz-Porszasz ZS, Banhegyi G, Mandl J (2001) The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sci* 69: 2533-2542.
11. Kim NH, Oh JH, Seo JA, Lee KW, Kim SG, et al. (2005) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 67: 167-177.
12. Kane R, Stevenson L, Godson C, Stitt AW, O'Brien C (2005) Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *Br J Ophthalmol* 89: 1638-1642.

13. Zhang Y, Shi Y, Liu Y, Dong H, Liu M, et al. (2007) Growth pattern switch of renal cells and expression of cell cycle related proteins at the early stage of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 159-164.
14. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399-408.
15. Semenza G (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64: 993-998.
16. Koch S, Claesson-Welsh L (2012) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006502.
17. Maxwell PH, Ratcliffe PJ (2002) Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 13: 29-37.
18. Li M, Kim WY (2011) Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med* 15: 187-195.
19. Kaelin WG, Jr. (2005) The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 627-638.
20. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, et al. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275.
21. Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM (2006) The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 66: 3688-3698.
22. Heidbreder M, Frohlich F, Johren O, Dendorfer A, Qadri F, et al. (2003) Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J* 17: 1541-1543.
23. Keith B, Johnson RS, Simon MC (2011) HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 12: 9-22.
24. Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, et al. (2012) An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486: 126-129.
25. Heikkila M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J (2011) Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci* 68: 3885-3901.
26. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N (2001) Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 808-813.
27. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, et al. (2005) Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J* 19: 1396-1406.
28. de Laplanche E, Gouget K, Cleris G, Dragounoff F, Demont J, et al. (2006) Physiological oxygenation status is required for fully differentiated phenotype in kidney cortex proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F750-760.

29. Zou AP, Yang ZZ, Li PL, Cowley AJ (2001) Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in renal medullary cells of rats. *Physiol Genomics* 6: 159-168.
30. Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtiskova A, Houstek J, et al. (2005) A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 26: 531-539.
31. Onesto C, Berra E, Grepin R, Pages G (2004) Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem* 279: 34217-34226.
32. Bolon C, Gauthier C, Simonnet H (1997) Glycolysis inhibition by palmitate in renal cells cultured in a two-chamber system. *Am J Physiol* 273: C1732-1738.
33. Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO (2009) Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation* 16: 572-592.
34. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, et al. (2012) Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 31: 1683-1694.
35. Hopgood MF, Knowles SE, Bond JS, Ballard FJ (1988) Degradation of native and modified forms of fructose-bisphosphate aldolase microinjected into HeLa cells. *Biochem J* 256: 81-88.
36. Bogdanovic E, Nguyen VP, Dumont DJ (2006) Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. *J Cell Sci* 119: 3551-3560.
37. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen PY, et al. (2011) FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest* 121: 2668-2678.
38. Adham SA, Coomber BL (2009) Glucose is a key regulator of VEGFR2/KDR in human epithelial ovarian carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 130-135.
39. Thomas JD, Johannes GJ (2007) Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA* 13: 1116-1131.
40. Thomas JD, Dias LM, Johannes GJ (2008) Translational repression during chronic hypoxia is dependent on glucose levels. *RNA* 14: 771-781.
41. Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Petrilli V, Malek M, et al. (2013) p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell* 49: 1049-1059.
42. Bouvier N, Fougeray S, Beaune P, Thervet E, Pallet N (2012) The unfolded protein response regulates an angiogenic response by the kidney epithelium during ischemic stress. *J Biol Chem* 287: 14557-14568.
43. Vordermark D, Kraft P, Katzer A, Bolling T, Willner J, et al. (2005) Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cancer Lett* 230: 122-133.
44. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, et al. (2004) Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha

expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem* 279: 14871-14878.

45. Stoka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, et al. (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15: 2445-2453.
46. Rosenberger C, Rosen S, Heyman SN (2005) Current understanding of HIF in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 28: 325-340.
47. McLaughlin EA, Hime GR (2011) Spermatids do it differently! Paip2a-the essential regulator of spermiogenesis? *Asian J Androl* 13: 122-124.
48. Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Moncorge O, Ohlmann T (2007) Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res* 35: e121.
49. Park EH, Lee JM, Pelletier J (2006) The Tie2 5' untranslated region is inhibitory to 5' end-mediated translation initiation. *FEBS Lett* 580: 1309-1319.
50. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ (2002) Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 13: 1792-1801.
51. Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, et al. (1998) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 17: 227-236.
52. Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovoni JS, et al. (2007) Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* 100: 305-308.
53. Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S (2005) The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res* 33: 6884-6894.
54. Onesto C, Hannoun-Levi JM, Chamorey E, Formento JL, Ramaioli A, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 94: 1516-1523.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A subset of mRNAs including VEGFA is overexpressed under low and high glucose.

Tubule suspensions were incubated for 4 hours under a pO_2 of approximately 50 mm Hg and varying glucose concentrations in 4 separate experiments. mRNA abundance was determined by RT-real time PCR. The results were standardized with hypoxia-insensitive L32 mRNA and expressed in % of the value at 5mM glucose except FLK1/VEGFR2 and TIE-2/TRK which were determined by semi-quantitative RT-PCR (representative experiment).

Figure 2. VEGFA and GLUT1 protein levels are increased by low and high glucose.

A, VEGF protein levels were determined with a pan-VEGF antibody and an anti-VEGF₁₆₅b antibody in lysates of the tubules pellets and in supernatants of the same suspension after 7 hours of incubation. Tubulin served as loading control in tubule lysates. No loading control is given for supernatants since no secreted protein can normalize the cell amount. Here equal volumes of supernatants were loaded, issuing from equal amounts of the same tubule suspension. **B**, GLUT 1, Aldolase A, FLK 1 and TIE 2 protein levels were determined in lysates of the tubules pellets of the same suspension after 7 hours of incubation. Tubulin served as loading control. The blots shown are representative of 3 separate experiments.

Figure 3. Low glucose increases HIF1A and HIF2A mRNA levels.

Tubule suspensions were incubated as described for 4 hours under different conditions of oxygenation and of glucose concentration in 4 independent experiments. Final pO_2 and final glucose concentration were determined for each experimental point. mRNA levels were determined by real time RT-PCR (HIF1A and L32) or by semi-quantitative PCR (HIF2A and L32). **A**, HIF1A mRNA values were standardized to L32 mRNA level then expressed in % of their value in control conditions (normoxia and normal glucose). **B**, Effect of oxygen (under normal glucose) and of glucose (under a pO_2 of 50 mm Hg) on HIF2A mRNA levels (semi-quantitative RT-PCR in duplicates, 4 separate experiments). A representative experiment is shown.

Figure 4. HIF1A and HIF2A proteins are not detectable in normal kidney tubules.

Tubules were incubated as in Figures 1 and 3. HIF1A and HIF2A proteins were determined after 4 hours by immunoblotting in 2 separate experiments. Positive control (CTL): proteins extracted from rat hippocampus under hypoxia. Actin served as loading control. A representative experiment is shown.

Figure 5. High and low glucose stabilize HIF1A, FLK1, TIE2 and VEGFA mRNAs.

Overall transcription was inhibited by DRB in tubule suspensions under low (3 mM, white circles), normal (5 mM, black diamonds) or high (18 mM, white triangles) glucose

concentrations. The decay of mRNA levels was determined by real time RT-PCR and normalized with 18S mRNA. As a control, the effect of glucose on L32 mRNA stability was determined in parallel. The results are plotted in log of the ratio to mRNA level at zero time, means \pm SD of 4 separate experiments, each point in duplicate.

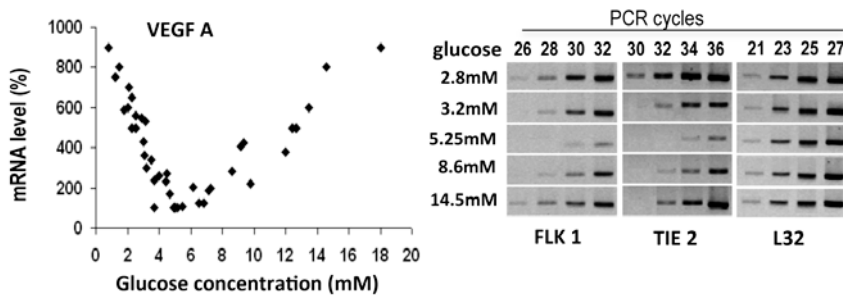
Figure 6. PAIP2 binds HIF1A and VEGFA mRNAs.

Renal cortical tubules were isolated from 3 rats and incubated during 4 hours in the presence of different glucose concentrations. **A**, HuR and PAIP2 expression in total tubule extracts was determined by immunoblotting in 2 separate experiments. Actin served as loading control. A representative experiment is shown. **B**, In 3 separate similar experiments, pelleted tubules were lysed, incubated with anti-PAIP2 antibody (PAIP2) or control IgG as non relevant antibody (NR), and interacting molecules were immunoprecipitated on beads. RNAs were extracted from beads with Trizol® and proteins lysed as described in the Material and Methods section. Bound PAIP2 was analyzed by immunoblotting. RNAs were reverse transcribed, and HIF1A and VEGFA cDNAs were amplified by semi-quantitative PCR or by SYBR qPCR. A representative experiment with qPCR is shown, in which the total amount of bound RNA (arbitrary units) was expressed as a function of the relative concentration in 6 ng cDNA ($1/2^{Ct}$) multiplied by the total amount of RNA extracted from the same amount of lysate.

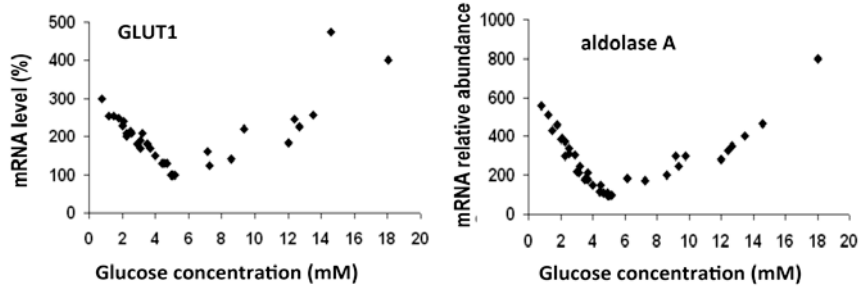
Figure 7. PAIP2 is more expressed in normal renal cortex than in clear cell nephrocarcinoma.

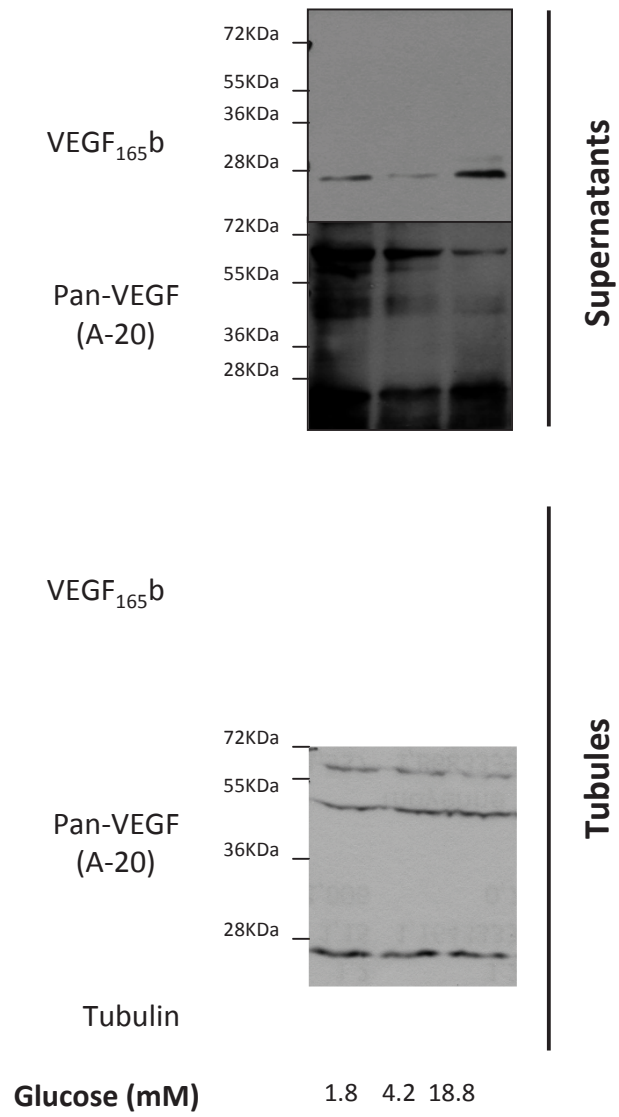
Tissue sections from kidneys bearing tumors were stained by immunohistochemistry with an anti-PAIP2 antibody coupled to HRP. **A, Left**: a grade 2 tumor of clear cell renal carcinoma is separated from normal tissue by a non stained fibrous capsule; **Right**: *Upper*, normal tissue is essentially stained in the epithelial cells; *Lower*, tumor tissue is almost not stained. **B**, Section of normal kidney cortex: tubules are stained in the cytoplasm exclusively, mesangial cells are less stained. **C**, Section across another clear cell renal carcinoma: **Left**, normal tubular cells are well stained even at the very limit between normal and fibrous tissue (limit nf); **Right**, tumoral cells (tu) are stained in many nuclei and fibrous capsule (fc) is merely stained in rare nuclei.

A) Transcripts involved in angiogenesis

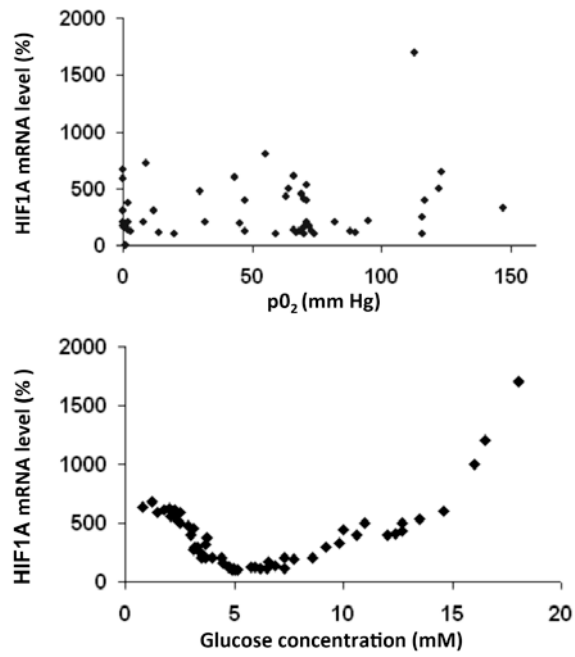


B) Transcripts involved in glycolysis

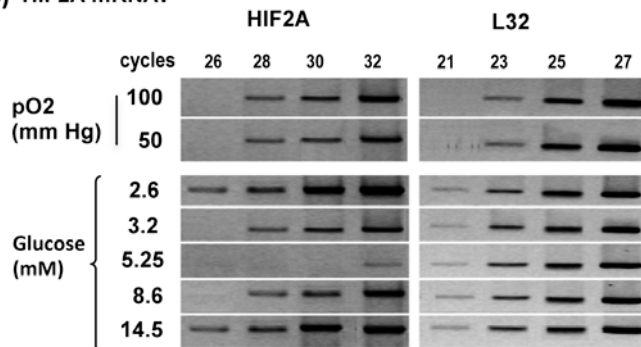


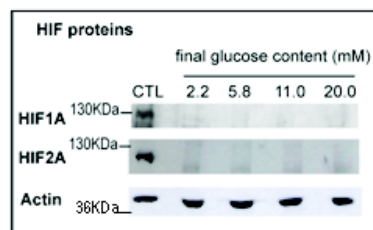


A)

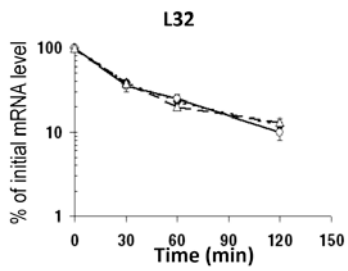
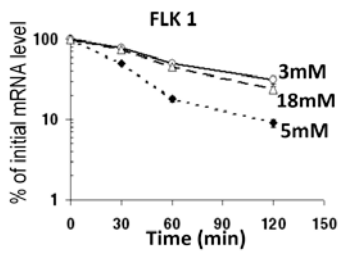
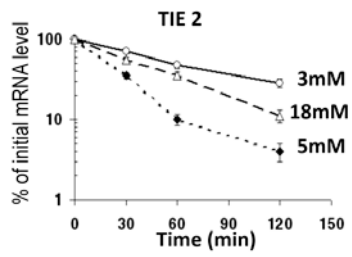
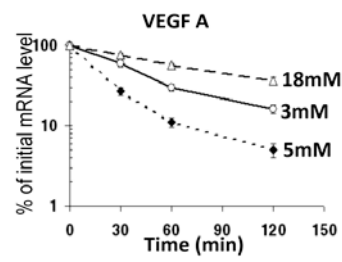
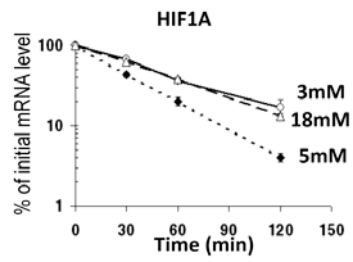


B) HIF2A mRNA:

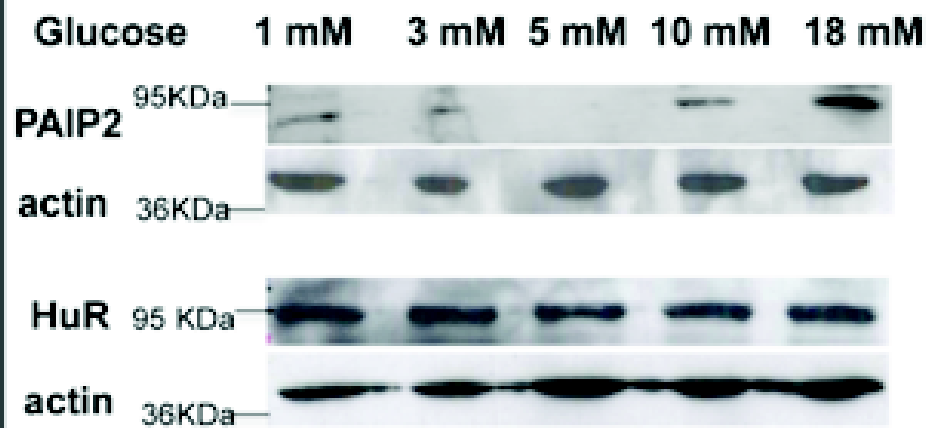




mRNA decay time

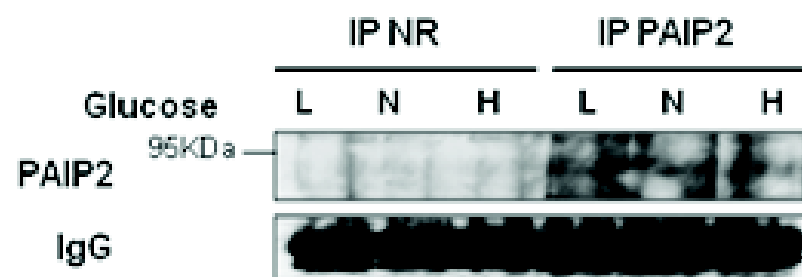


A- Protein expression

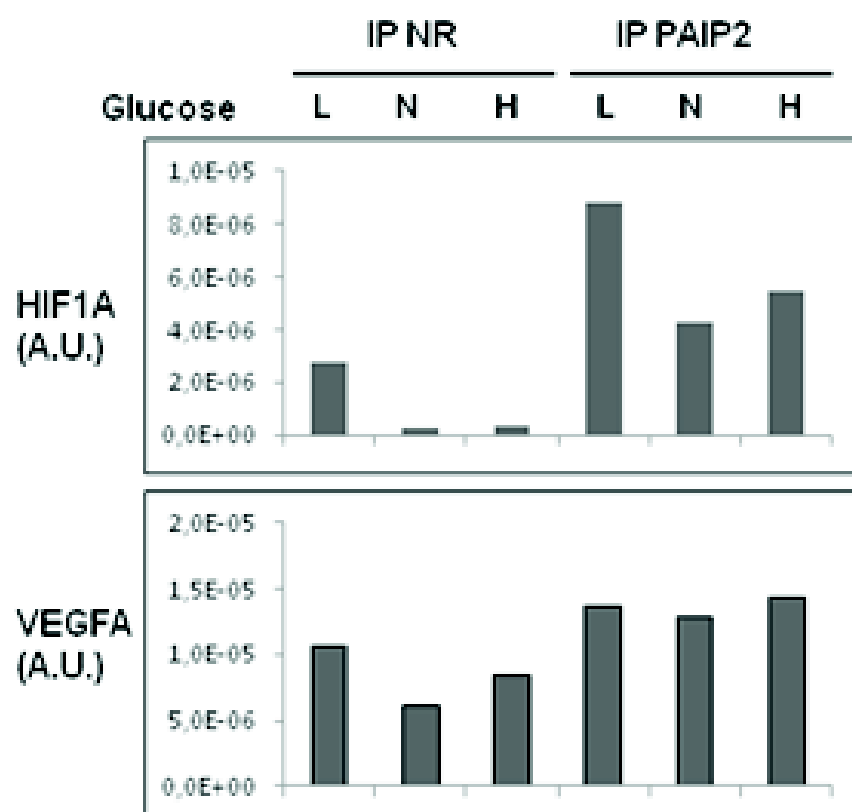


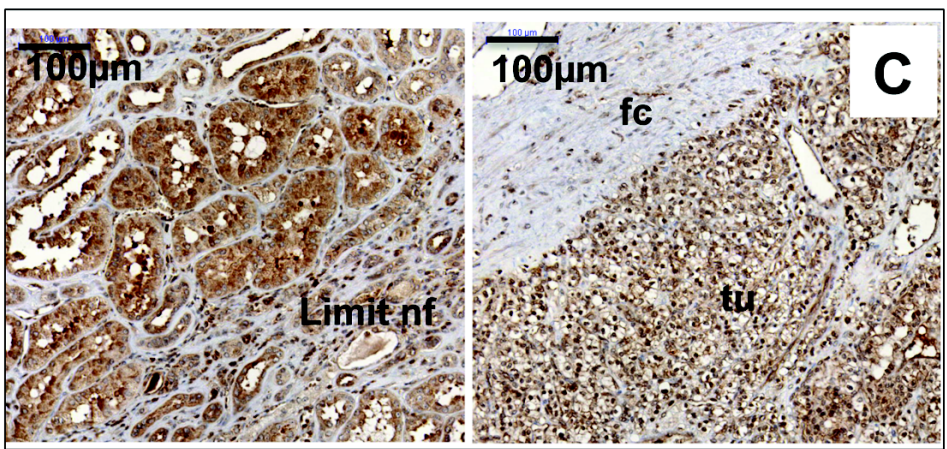
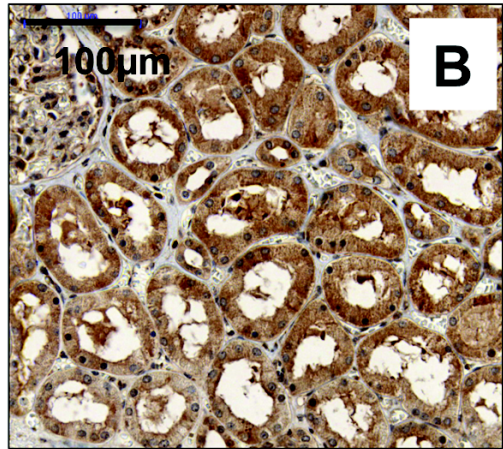
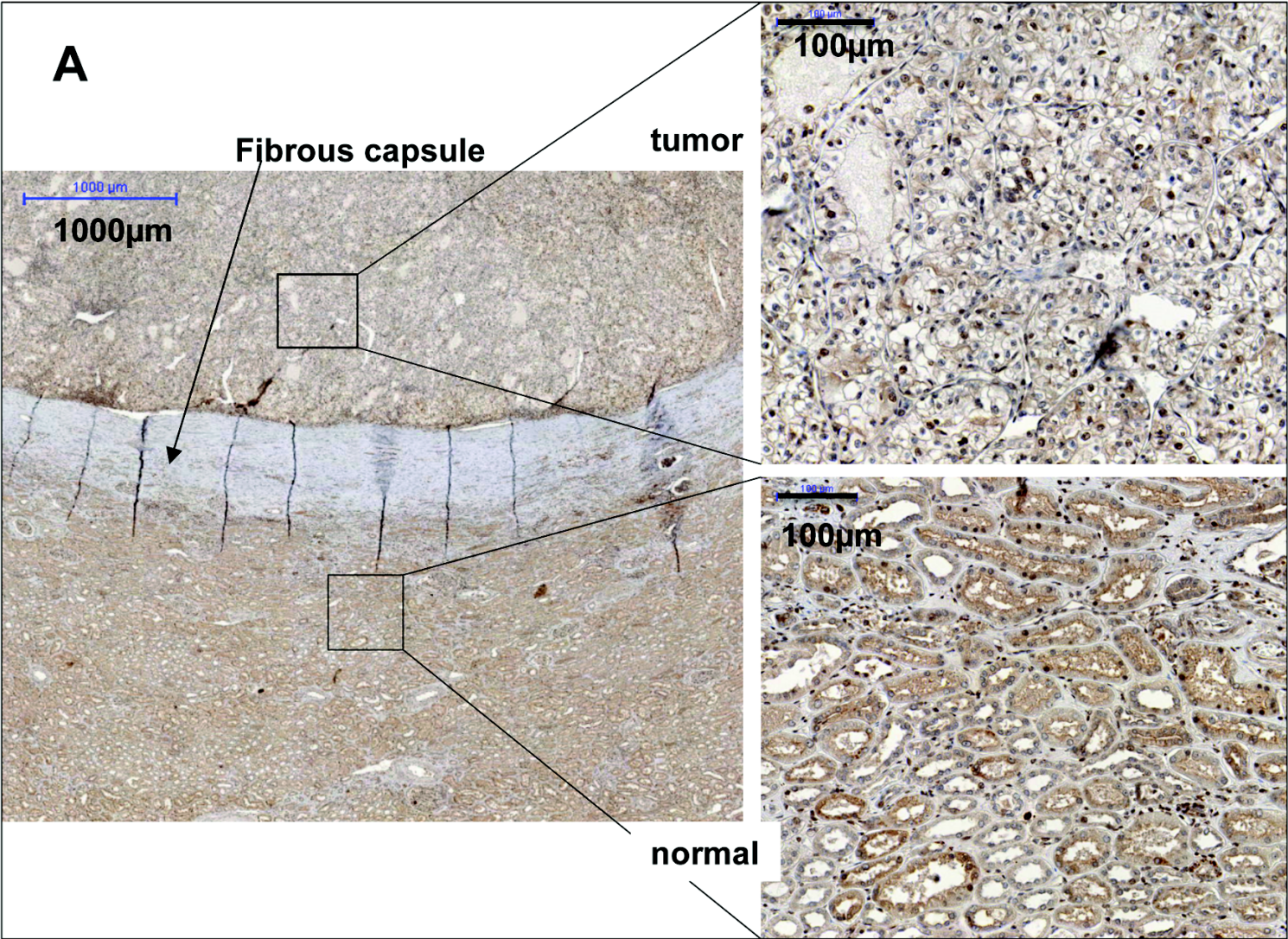
B- Immunoprecipitation of PAIP2-bound RNA

WB PAIP2



RT-PCR of PAIP2-bound RNA





ANNEXE 2

Abnormal Expression of the Pre-mRNA Splicing Regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in Non Small Cell Lung Carcinoma

Stephanie Gout^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{1,2,3}, Asma Boudria^{1,2}, Romain Drissi^{1,2}, Sylvie Lantuejoul^{1,2,3}, Sylvie Gazzeri^{1,2}, Beatrice Eymin^{1,2*}

1 Equipe 2 Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, INSERM, U823, Grenoble, France, **2** Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, **3** Département de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

Abstract

Splicing abnormalities frequently occur in cancer. A key role as splice site choice regulator is played by the members of the SR (Ser/Arg-rich) family of proteins. We recently demonstrated that SRSF2 is involved in cisplatin-mediated apoptosis of human lung carcinoma cell lines. In this study, by using immunohistochemistry, we demonstrate that the SR proteins SRSF1 and SRSF2 are overexpressed in 63% and 65% of lung adenocarcinoma (ADC) as well as in 68% and 91% of squamous cell lung carcinoma (SCC), respectively, compared to normal lung epithelial cells. In addition, we show that SRSF2 overexpression correlates with high level of phosphorylated SRSF2 in both ADC ($p < 0.0001$) and SCC ($p = 0.02$), indicating that SRSF2 mostly accumulates under a phosphorylated form in lung tumors. Consistently, we further show that the SR-phosphorylating kinases SRPK1 and SRPK2 are upregulated in 92% and 94% of ADC as well as in 72% and 68% of SCC, respectively. P-SRSF2 and SRPK2 scores are correlated in ADC ($p = 0.01$). Using lung adenocarcinoma cell lines, we demonstrate that SRSF1 overexpression leads to a more invasive phenotype, evidenced by activation of PI3K/AKT and p42/44MAPK signaling pathways, increased growth capacity in soft agar, acquisition of mesenchymal markers such as E cadherin loss, vimentin and fibronectin gain, and increased resistance to chemotherapies. Finally, we provide evidence that high levels of SRSF1 and P-SRSF2 proteins are associated with extensive stage (III–IV) in ADC. Taken together, these results indicate that a global deregulation of pre-mRNA splicing regulators occurs during lung tumorigenesis and does not predict same outcome in both Non Small Cell Lung Carcinoma histological sub-types, likely contributing to a more aggressive phenotype in adenocarcinoma.

Citation: Gout S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, et al. (2012) Abnormal Expression of the Pre-mRNA Splicing Regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in Non Small Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 7(10): e46539. doi:10.1371/journal.pone.0046539

Editor: Rui Medeiros, IPO, Inst Port Oncology, Portugal

Received: May 24, 2012; **Accepted:** August 31, 2012; **Published:** October 10, 2012

Copyright: © 2012 Gout et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2007), by the Comité Départemental Savoie de la Ligue Nationale contre le Cancer, by the Institut National du Cancer/Direction de l'Hospitalisation et Organisation des Soins (INca/DHOS) (Appel d'Offre Recherche Translationnelle 2010), by the Fondation de France (Projet Grande Ampleur) and by the Association pour la Recherche Contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

Introduction

More than 90% of human genes undergo pre-mRNA alternative splicing leading to the synthesis of various protein isoforms with different biological properties [1]. Splicing defects of critical genes have been causally linked to various diseases, including cancer [2–4]. Lung cancer is the most common cause of mortality among all cancers, accounting for an estimated 1.3 million deaths worldwide annually. Importantly, a genome wide analysis of alternative splicing events previously demonstrated that a large number of known oncogenes and tumor suppressor genes are alternatively spliced and differentially expressed in lung adenocarcinoma, compared to normal lung [5]. In this histological subtype, it was recently shown that of 5183 profiled alternative exons, four displayed tumor-associated changes in the majority of the patients, namely VEGF-A, MACF1, APP and NUMB genes [6]. Moreover, we and others have reported splicing modifications of genes such as caspases, Bcl-x, CD44, FLIP, MDM2 and VEGF-A in primary lung cancer and cell lines [7–14]. Therefore,

widespread alternative splicing changes occur in lung cancer and impact cell signaling in a manner that likely contributes to tumorigenesis.

The mechanisms leading to aberrant alternative splicing in cancer are poorly understood. Splicing modifications are associated with cis-acting mutations that affect alternative splice sites. Furthermore, it has been proposed that abnormal expression and/or activity of trans-splicing regulatory proteins mainly contribute to the abnormal alternative splicing patterns detected in tumors [15]. The SR protein family is one of the most important classes of splicing regulators that display essential roles in the enhancement of constitutive and alternative pre-mRNA splicing, as well as in other aspects of gene expression [16–19]. Activity of SR proteins is highly regulated by extensive and reversible phosphorylation of serine residues. These phosphorylations modulate protein–protein interactions within the spliceosome [20] and regulate the activity and sub-cellular distribution of SR proteins [21]. Therefore, changes in the phosphorylation state of SR proteins play a critical role in the control of their activity. Several kinases that

Table 1. Demographics and clinical characteristics of the patients.

Demographics and Clinical parameters	Histology	
	ADC (%)	SCC (%)
Median age \pm SD (years)	61 \pm 10	64 \pm 10
Male	41 (76)	52 (98)
Female	13 (24)	1 (2)
Stage I	26 (48)	12 (22)
Stage II	11 (21)	10 (19)
Stage III	10 (18)	27 (51)
Stage IV	7 (13)	4 (8)
pT1	16 (30)	10 (19)
pT2	26 (48)	18 (34)
pT3	7 (13)	13 (24)
pT4	5 (9)	12 (23)
N0	35 (65)	15 (29)
N1	11 (20)	24 (45)
N2	8 (15)	14 (26)

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; SD, standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0046539.t001

phosphorylate SR proteins have been identified. They include the SR protein kinases (SRPKs) 1 and 2, the CLK/STY, the DNA topoisomerase I and AKT [21–24]. To date, only a few studies have investigated the status of SR proteins in human lung tumors. It was recently shown that the SR protein SRSF1 (former SF2/ASF), previously described as an oncogene [25], is overexpressed in primary non small cell lung carcinoma and controls the expression of survivin, an anti-apoptotic protein [26]. Nothing is known about the status of phosphorylated SR proteins or SRPK kinases in lung cancer. Interestingly, we recently demonstrated that phosphorylation of SRSF2 (former SC35) by SRPK2 is involved in cisplatin-mediated apoptosis of human lung carcinoma cell lines [10].

In this study, we investigated the status of SRSF1, SRSF2 and its phosphorylated form P-SRSF2, as well as of SRPK1 and SRPK2 in a series of 107 NSCLC, including 54 adenocarcinoma (ADC) and 53 squamous cell carcinoma (SCC). Our results reveal a global overexpression of these splicing regulators in NSCLC compared to normal lung tissues, that correlate with more aggressive clinico-pathological features in ADC. In agreement with these data, we provide evidence that overexpression of SRSF1 in cellular models derived from human lung adenocarcinoma leads to a more aggressive phenotype with activation of p42/44MAPK and AKT signaling pathways, increased colony formation in soft agar, epithelial to mesenchymal transition and resistance to carboplatin and paclitaxel.

Materials and Methods

Patients and Tissue Samples

One hundred and seven human Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) and 25 associated normal lung parenchyma were included in this study. Tumors consisted of 54 adenocarcinoma (ADC) and 53 squamous cell carcinoma (SCC; Table 1). Tissue samples were collected from lung resection of lung tumors,

and stored for scientific research in a biological resource repository (Centre de Ressources Biologiques, CHU Albert Michallon, Grenoble Hospital). National ethical guidelines were followed. All patients enrolled in this trial provided written informed consent. Tissue banking and research conduct was approved by the Ministry of Research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud Est). Tumor tissues and normal lung parenchyma taken at distance from the bulk of the tumor were immediately frozen and stored at -80°C until use. For histological classification, tumor samples were fixed in formalin, and diagnosis was made on paraffin-embedded material using the 2004 WHO classification of lung criteria [27]. For each case, one section from the most representative block was chosen. These sections always contained more than 70% of tumor cells.

Immunohistochemistry

Seven-micrometer-thick serial frozen sections were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 10 min. A three-stage indirect immunoperoxidase technique was done either manually for SRSF1, SRSF2 and phosphorylated SRSF2, or on the Ventana autostainer (Ventana Medical International, Inc.) for SRPK1 and SRPK2. We used antibodies against SRSF1 (#32-4500, Invitrogen, dilution 1/1000), SRSF2 (SC35, #556363, BD Pharmingen, dilution 1/500), phospho-SRSF2 (#S4045, Sigma, dilution 1/500), SRPK1 (#611072, BD Biosciences, dilution 1/500) and SRPK2 (#611118, BD Biosciences, dilution 1/500). Incubation with the primary antibody at 4°C overnight (for manual technique) or for 1 hour at room temperature on Ventana autostainer was followed by exposition to the secondary biotinylated antibody, and then by the amplification system avidin-biotin complex. Negative control consisted in omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype.

Immunostainings were evaluated independently by two pathologists who were blinded to all clinicopathological data (EB, SL). For immunostainings evaluation, a score (0–300) was established by multiplying the percentage of tumor labelled cells (0 to 100%) by the staining intensity (0, null; 1, low; 2, moderate; 3, strong). Scores obtained for alveolar type II pneumocytes and bronchial cells in normal lung tissues taken at distance from the tumor were considered as normal scores for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. Indeed, bronchial basal cells are considered as candidate cancer stem cells for squamous cell lung carcinoma, basaloids and Small Cell Lung Carcinoma while type II pneumocytes-CLARA cells are considered as bronchiolo alveolar carcinoma stem cells (BASC). According to median scores in normal tissues and to the distribution histograms (Figure S1), tumors were sub-divided in two classes for SRSF1 (class 1: low <100 ; class 2: high ≥ 100) and SRSF2 (class 1: low <150 ; class 2: high ≥ 150). For P-SRSF2, tumors were sub-divided in three classes (class 1: low <100 ; class 2: moderate ≥ 100 ; class 3: strong >175). For SRPK1 and SRPK2, distinct cut-off were chosen for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on the different intensity of staining observed in alveolar type II pneumocytes (undetectable levels for both kinases) or bronchial cells (mean score of 50 for both kinases). According to these normal scores and to the distribution histograms (Figure S1), adenocarcinoma and squamous cell carcinoma were sub-divided in three classes as follows: class 1: low ≤ 50 or <100 ; class 2: moderate <200 or ≥ 100 ; class 3: strong ≥ 200 or >200 , respectively.

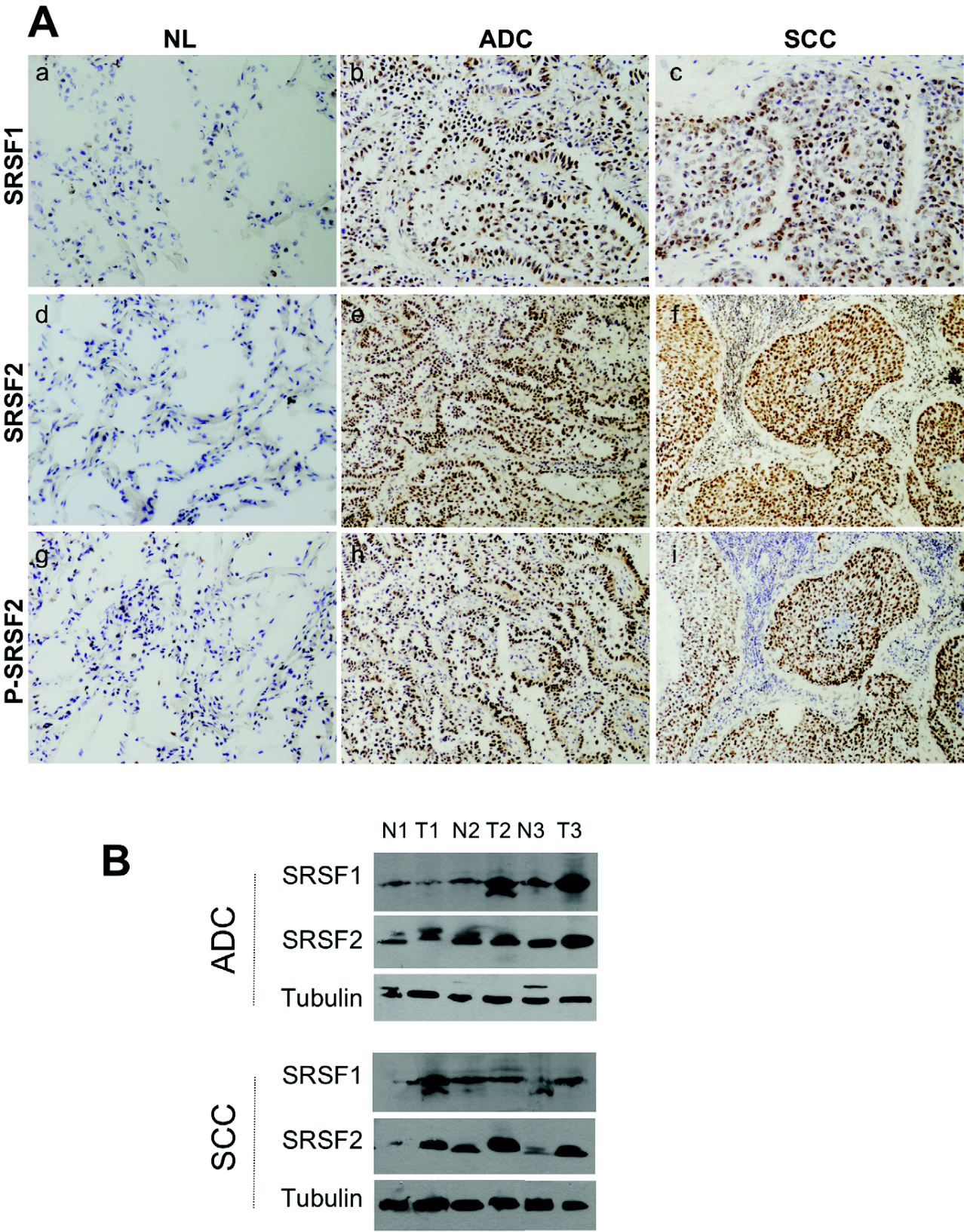


Figure 1. Expression of SRSF1, SRSF2 and phosphorylated SRSF2 proteins in NSCLCs. A, Representative immunostaining from frozen section of normal lung parenchyma and lung cancer tissue with anti SRSF1 (a, b, c), anti SRSF2 (d,e,f) and anti phospho-SRSF2 (g, h, i) antibodies [(a, d, g) normal lung; (b, e, h) ADC; (c, f, i) SCC; immunoperoxidase and haematoxylin counterstaining]. B, Representative western blots demonstrating

overexpression of SRSF1 and SRSF2 proteins in lung tumors compared with their matched normal lung tissues. (NL, normal lung; ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma). doi:10.1371/journal.pone.0046539.g001

Antibodies and Immunoblotting

Immunoblotting experiments were done as previously described [7]. The antibodies were anti-SRSF2 (4F11, Euromedex), anti-tubulin (TEBU, Le Perray-en-Yvelines), anti-AKT, anti-phospho-AKT(Ser473), anti-phospho-MAPK(ERK1/2) (Thr202/Tyr204) and anti-p44/42 MAPK from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines), anti-N-cadherin (32/N-Cadherin) and anti-E-cadherin (36/E-Cadherin) from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), anti-vimentin (clone V9) and anti-fibronectin (clone FN-15) from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Cell Lines, Transfection, Treatments, Cytotoxic and Soft Agar Assays

H358, H1299 and H2170 cells were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS. They were transfected either with a pcDNA3 empty vector or with a pcDNA3-SRSF1-Myc tagged vector using Fugene 6 reagent (Roche Diagnostic, France). H358 transfected cells were grown in RPMI-1640 medium containing 800 µg/ml geneticin (G418) for at least 4 weeks in order to select stable transfectants. Single colonies were isolated and expanded for further analyses. H1299 and H2170 transfected cells were selected during 6 days using 800 µg/ml G418 before analysis of EMT markers. U0126, wortmannin, etoposide, paclitaxel and carboplatin were all purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Cytotoxic experiments were performed using the methylene blue colorimetric assay as previously described [7]. Anchorage-independent growth was determined by assaying colony formation in soft agar. Briefly, H358-Ctl and H358-SRSF1 cells were resuspended in RPMI containing 10% FCS and 0.3% agar noble (DifcoTM, BD Biosciences) and plated in quadruplicate on a firm 0.6% agar noble base in 12-well plates (15,000 cells/well). Colonies of cells were allowed to grow 21 days in a 37°C and 5% CO₂ incubator. Colonies were then observed and counted under an inverted microscope (Zeiss Axiovert 100M). The colony formation assay was performed in triplicate.

RT-qPCR Analyses

Total RNA was extracted from normal and human lung tumors samples using RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and integrity was determined using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech). Quantitative real-time reverse transcript (RT)-qPCR was

performed using the LightCycler[®] 480 Real-Time PCR system (Roche). One microgram of total RNA was subjected to cDNA synthesis with Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and subsequently amplified during 45 PCR cycles using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega). Primers used for the detection of *GAPDH* and *SRSF2* mRNAs were detailed previously [9]. Primers for amplification of *SRSF1*, *SRPK1* and *SRPK2* mRNAs were purchased from SA Biosciences (Qiagen). Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of specific target gene to *GAPDH* gene (reference gene), thus normalizing the expression of target gene for sample to sample differences in RNA input.

Statistical Analysis

The staining scores were compared in different categories using Fisher's exact test and Mann-Whitney test. All tests were two-tailed and p values <0.05 were considered significant. The statistical analyses were done using Statview software (Abacus Concepts).

Results

Overexpression of SRSF1 Protein is Associated with Extensive Stage (III–IV) Tumors

We first analyzed the status of SRSF1 protein in our series of lung tumors. Of note, analysis of phospho-SRSF1 protein was not possible due to the lack of a specific anti-phospho-SRSF1 antibody. SRSF1 was slightly expressed in normal lung epithelium adjacent to tumor cells as well as in normal lung tissues localized at distance from lung cancer, with a faint nuclear staining on alveolar type II pneumocytes and a stronger nuclear staining on bronchial cells (mean score of 40 and 70 respectively, Figure 1A). Compared to these normal lung tissues, SRSF1 was overexpressed in 65% (70/107; p<0.0001 versus normal) of NSCLC, with almost the same frequency in adenocarcinoma (ADC; 34/54; 63%; p<0.0001 versus normal) and squamous cell carcinoma (SCC; 36/53; 68%; p<0.0001 versus normal) (Figure 1A & Figure S1; Table 2). SRSF1 belongs to a specific subset of SR proteins that shuttle continuously between the nucleus and the cytoplasm [28]. In NSCLC, SRSF1 accumulated predominantly in the nucleus thereby indicating that, besides its overexpression, modifications of SRSF1 sub-cellular distribution could also take place in lung tumors. In order to validate these IHC data, 6 of the 107 tumor

Table 2. Immunohistochemical analysis of SRSF1 and SRSF2 proteins expression in non-small cell lung cancer according to histological subtype.

	SRSF1 (%)		SRSF2 (%)		Phospho-SRSF2 (%)			P value
	Class 0	Class 1	Class 0	Class 1	Class 0	Class 1	Class 2	
ADC	20(37)	34(63)	19(35)	35(65)	14(26)	12(22)	28(52)	<0.0001
SCC	17(32)	36(68)	5(9)	48(91)	11(21)	8(15)	34(64)	<0.0001
NSCLC	37(35)	70(65)	24(22)	83(78)	25(23)	20(19)	62(58)	<0.0001

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0–100%) by the level of intensity (1–3). According to this, tumor samples were grouped into several classes (see 'Materials and Methods' section). For SRSF1 and SRSF2, class 0 (normal expression as compared to normal lung), class 1 (high staining considered as overexpression). For phospho-SRSF2, class 0 (normal expression), class 1 (moderate overexpression) and class 2 (high overexpression). Statistical analysis was done using Fisher's exact test. doi:10.1371/journal.pone.0046539.t002

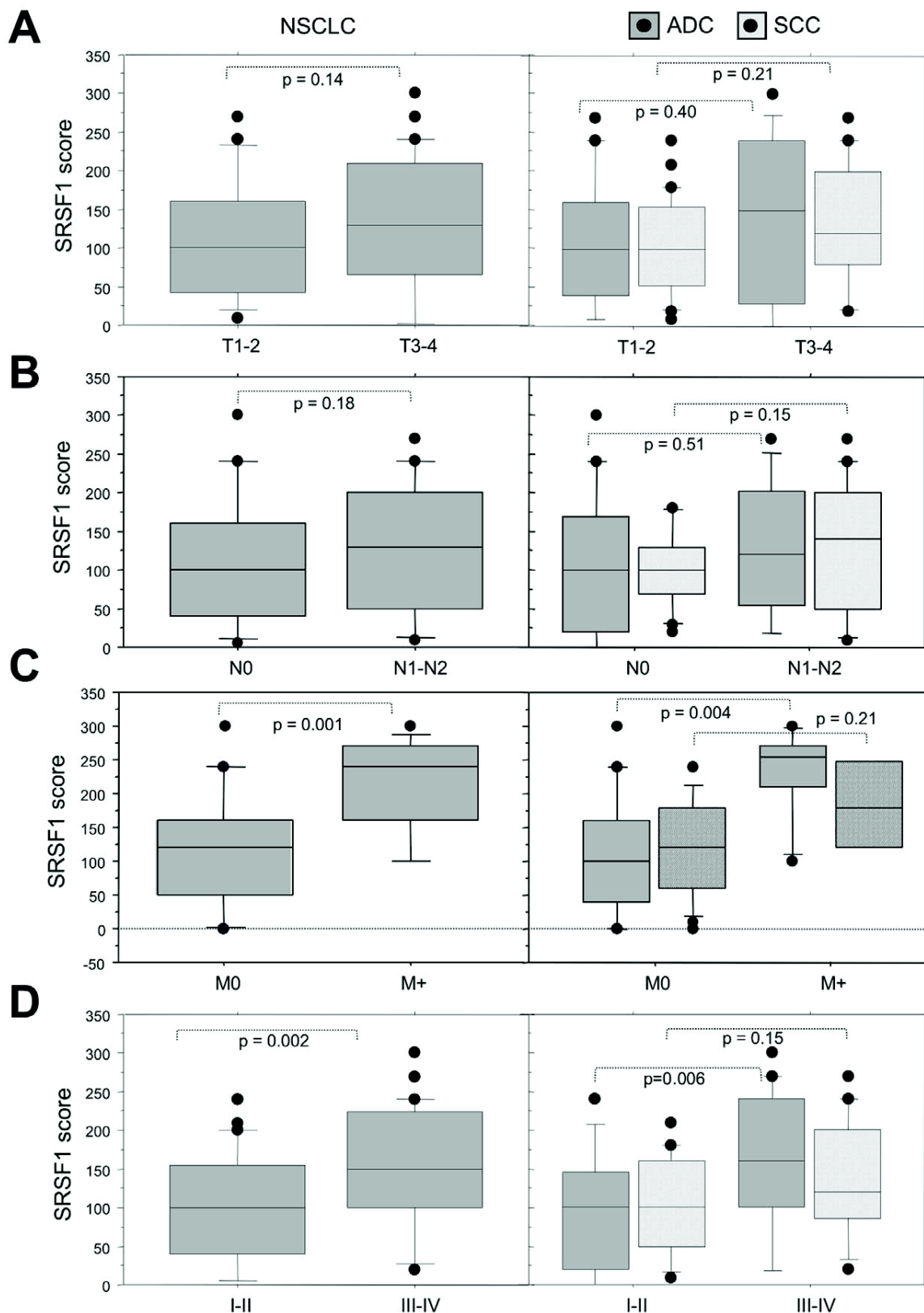


Figure 2. SRSF1 scores according to the clinico-pathological parameters in NSCLC subtypes. Distribution of SRSF1 scores according to the tumor size (A), the nodal status (B), the presence of metastases at distance (C) and the pTNM stage (D), in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test.
doi:10.1371/journal.pone.0046539.g002

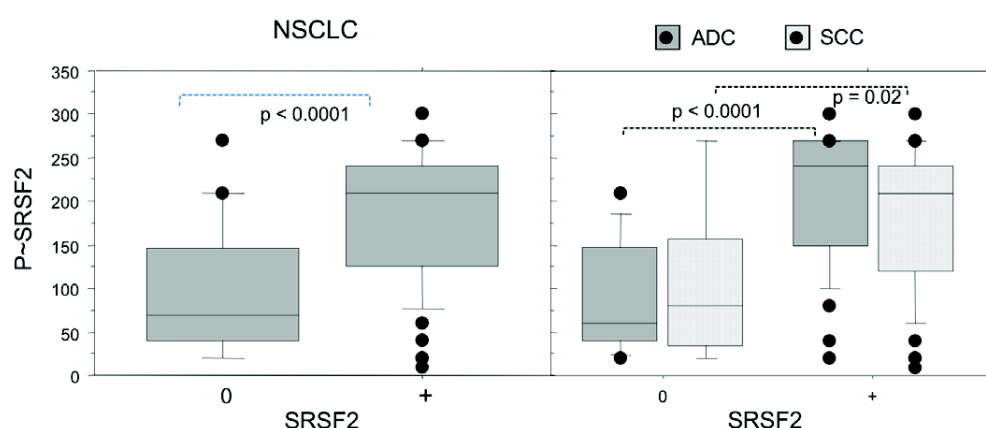


Figure 3. Relationship between SRSF2 overexpression and its phosphorylated status in NSCLC subtypes. Distribution of phospho-SRSF2 scores in tumors displaying either normal SRSF2 expression (class 0) or SRSF2 overexpression (class +), in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test.
doi:10.1371/journal.pone.0046539.g003

samples and their matched normal lung tissues were analyzed for SRSF1 protein expression by western blotting (Figure 1B and data not shown). Again, we observed that SRSF1 protein was overexpressed in NSCLC compared to associated normal lung tissues. In order to test whether SRSF1 protein overexpression correlates with *SRSF1* mRNA increase, we performed RT-QPCR in a series of 25 NSCLCs and their matched normal lung. We did not find any correlation between SRSF1 mRNA and protein levels (Figure S2).

To further characterize the role of SRSF1 during lung carcinogenesis, we analyzed the relationships linking the IHC data and some clinicopathological features (Figure 2). High levels of SRSF1 expression were associated with the presence of metastases at distance (M+, $p = 0.001$) and extensive stage (III/IV, $p = 0.002$) in NSCLC. When histological sub-types were distinguished, a correlation between the presence of metastases ($p = 0.004$) and extensive stage III/IV ($p = 0.006$) was found in ADC only (Figures 2C, 2D and Figure S3). Taken together, these results demonstrate that SRSF1 protein is overexpressed in a vast majority of NSCLC compared to normal lung tissues and is associated with criteria of tumor invasiveness in lung adenocarcinoma.

Expression of SRSF2 and Phospho-SRSF2 Proteins is Correlated in NSCLC

Next, we investigated the status of SRSF2 and its phosphorylated form (P-SRSF2) in the same series of tumor samples by IHC. The anti-phospho-SRSF2 antibody was specific of phosphorylated SRSF2 as it strongly detected SRSF2 but not SRSF1 protein in cellular models stably overexpressing each protein (Figure S4). A moderate nuclear staining of SRSF2 and P-SRSF2 proteins was observed in alveolar type II pneumocytes (mean scores of 80 and 46, respectively), whereas bronchial cells exhibited a stronger nuclear staining (mean scores of 160 and 70, respectively) (Figure 1A). Compared to these normal lung epithelia, high levels of SRSF2 nuclear staining were observed in 83 out of 107 (78%) NSCLC ($p < 0.0001$ versus normal; Table 2). According to each histological subtype, overexpression of SRSF2 protein was detected in 35/54 ADC (65%; $p < 0.0001$ versus normal) and 48/53 SCC (91%; $p < 0.0001$ versus normal) (Table 2; Figure 1A and Figure S1). Similarly, and compared to normal lung tissues, a moderate (class 1, scores ranging from 100 to 175) or strong (class

2, scores ranging from 176 to 300) P-SRSF2 immunostaining was observed in 82/107 (77%) NSCLC, including 40/54 (74%) ADC and 42/53 (79%) SCC ($p < 0.0001$ versus normal; Table 2 and Figure 1A). Interestingly, SRSF2 and P-SRSF2 levels were highly correlated in NSCLC ($p < 0.0001$), ADC ($p < 0.0001$) and SCC ($p = 0.02$) (Figure 3). In order to validate these IHC results, SRSF2 protein expression was studied by western blotting in 6 of the 107 tumor samples and their matched normal lung tissues (Figure 1B). Again a good concordance was found between both techniques. Overall, these results demonstrate that both SRSF2 and P-SRSF2 proteins are overexpressed and correlate in a vast majority of NSCLC. Of note, when *SRSF2* mRNA levels were analyzed in the same samples than SRSF1, no correlation was found between SRSF2 mRNA and protein levels (Figure S2).

To go further, we analyzed the relationships linking SRSF2 and P-SRSF2 status and some of the clinicopathological characteristics. High scores of either SRSF2 or P-SRSF2 were associated with larger size tumors (T3–T4) in ADC ($p = 0.03$; Figure 4A & 4C). Furthermore, high levels of P-SRSF2 correlated with extensive stage (III–IV) in ADC ($p = 0.02$; Figure 4D). These results indicate that accumulation of P-SRSF2 is associated with a more aggressive phenotype in adenocarcinoma.

Both SRPK1 and SRPK2 Kinases are Overexpressed in NSCLC

We recently reported that the SRPK1 and SRPK2 kinases control SRSF2 phosphorylation in cellular models derived from NSCLC [10]. Therefore, we evaluated the status of these kinases by IHC in our series of primary tumors. SRPK1 and SRPK2 proteins were faintly expressed in normal bronchial cells (mean score of 30 and 50, respectively) with a nuclear and cytoplasmic pattern, but were undetectable in alveolar type II pneumocytes (Table 3 and Figure 5). Compared to these normal lung tissues, SRPK1 was upregulated in 90/107 (84%), 52/54 (92%) and 38/53 (72%) NSCLC, ADC and SCC, respectively ($p < 0.0001$ versus normal; Table 3). In the same way, overexpression of SRPK2 was observed in 87/107 (81%), 51/54 (94%) and 36/53 (68%) NSCLC, ADC and SCC respectively (Table 3; $p < 0.0001$ versus normal). Both kinases exhibited a nuclear and cytoplasmic pattern. These results provide the first evidence that SRPK1/SRPK2 kinases are overexpressed in NSCLC. Again, a good concordance was observed between IHC and western blot data (Figure 5B). Of

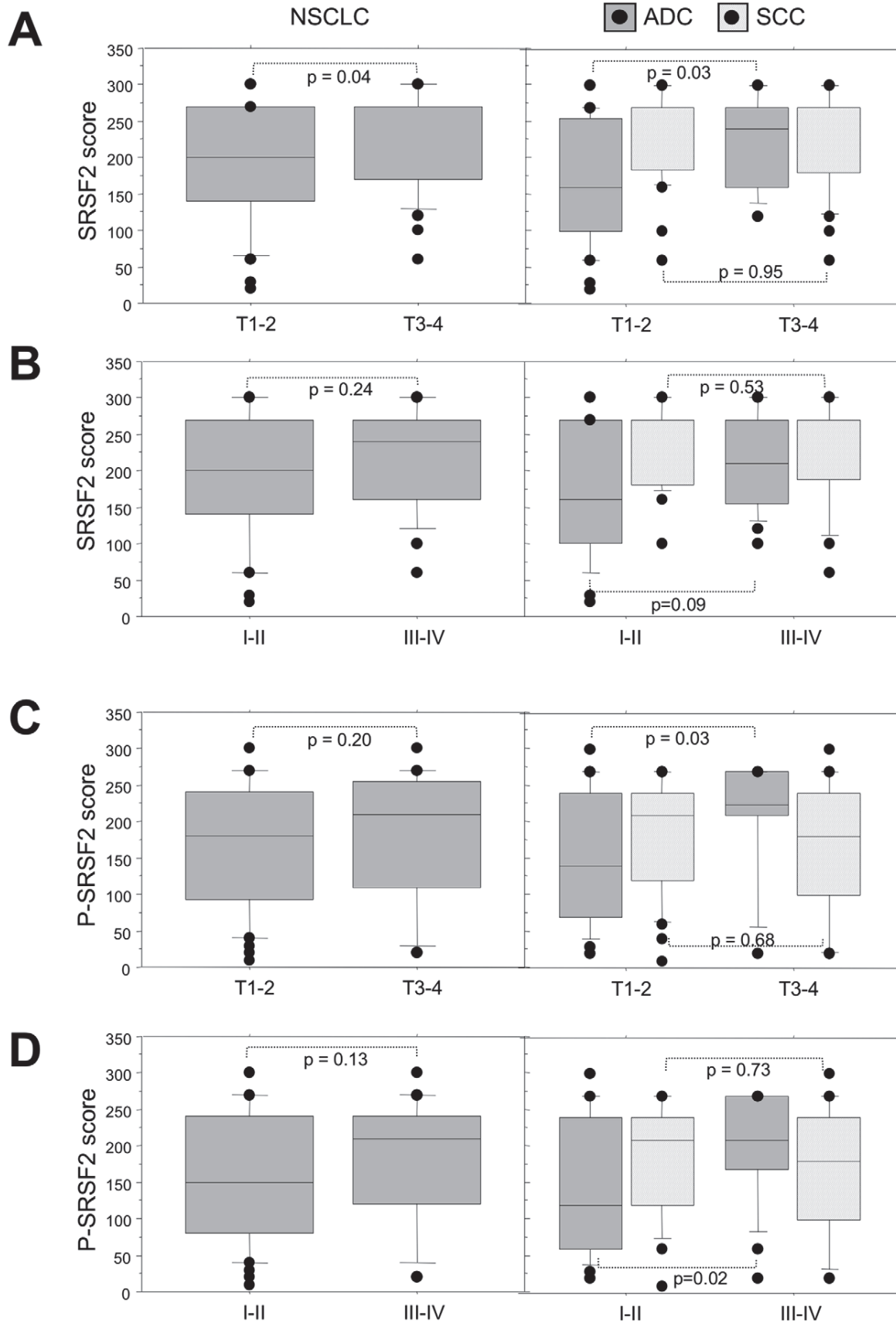


Figure 4. Expression of SRSF2 and its phosphorylated form according to the clinico-pathological parameters in NSCLC subtypes. Distribution of SRSF2 and phospho-SRSF2 scores according to the tumor size (A, C) and the stage (B, D), in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test.
doi:10.1371/journal.pone.0046539.g004

note, as for *SRSF1* and *SRSF2*, no correlation was found between SRPK1/SRPK2 proteins and mRNA levels in tumors (Figure S2). These data suggest that post-transcriptional mechanisms control the expression level of splicing regulators in human lung tumors. Interestingly, a direct correlation was detected between P-SRSF2 and SRPK2 stainings in ADC ($p = 0.01$; Figure 6). By contrast, no relationship was found between SRPK1 and P-SRSF2 expression, whatever the histological sub-type (data not shown). These data suggest that SRPK2 is the main kinase phosphorylating SRSF2 in ADC, consistent with our previous results obtained in cell lines [10]. Finally, when clinicopathological parameters were analysed as regard to either SRPK1 or SRPK2 status, high levels of SRPK2 tended to be associated with extensive stage in ADC ($p = 0.06$, Figure 6).

SRSF1 Overexpression Promotes a More Aggressive Phenotype in Adenocarcinoma

We recently demonstrated that SRSF2 overexpression controls apoptosis and contributes to the response of NSCLC cell lines to cisplatin [10]. To further study the consequences of increased SRSF1 expression in NSCLC, the human lung adenocarcinoma cell line H358 was stably transfected with an expression vector encoding a myc-tagged SRSF1 protein and several clones overexpressing myc-SRSF1 were obtained. The results of a representative clone are presented. Compared to control cells, SRSF1-overexpressing cells accumulated P-AKT(Ser473) and phospho p42/p44MAPK proteins (Figure 7A). In addition, they generated significantly more colonies in soft agar (Figure 7B). SRSF1-overexpressing cells also evidenced an epithelial to mesenchymal transition (EMT) as demonstrated by the loss of epithelial markers such as E-cadherin and the acquisition of mesenchymal markers such as vimentin, fibronectin and N-cadherin (Figure 7C). In order to extend these data, two other cell lines, namely the H1299 adenocarcinoma and the H2170 squamous carcinoma cells, were transfected either with a control plasmid or with a plasmid encoding a myc-tagged SRSF1 protein and subjected to G418 selection for 6 days. Acquisition of mesenchymal markers such as N-cadherin or vimentin was detected in H1299 cells overexpressing SRSF1 (Figure 7D),

thereby confirming the results obtained in H358 stable clones. In contrast, such EMT was not detected in H2170 cells overexpressing SRSF1 (Figure 7D). In addition, EMT was partially reversed when H358 SRSF1-overexpressing cells were cultured in presence of wortmannin or U0126, two pharmacological inhibitors targeting AKT and MEK/ERK signaling pathways respectively (Figure 7E). Taken together, these results demonstrate that SRSF1 overexpression promotes a more aggressive phenotype in lung adenocarcinoma but not in lung squamous carcinoma cell lines. They are consistent with the IHC results showing high levels of SRSF1 in extensive stage ADC only ($p = 0.006$).

SRSF1 Overexpression Increases Resistance to Chemotherapy

Acquisition of an EMT phenotype has been associated with resistance to chemotherapy in NSCLCs [29]. Therefore, we tested whether SRSF1 overexpression affects the sensitivity of lung tumor cells to chemotherapeutic agents. We observed that SRSF1 protein accumulates in H358 cells treated with carboplatin and paclitaxel but not with etoposide (Figure 8A). In addition, H358 cells stably overexpressing SRSF1 were more resistant to carboplatin and paclitaxel than control cells (Figure 8B). This was not an unspecific effect related to SRSF1 overexpression since both control and SRSF1-overexpressing cells exhibited similar sensitivity to etoposide (Figure 8B). Altogether, these data indicate that SRSF1 is a component of the lung tumor cells response to chemotherapies.

Discussion

A growing body of evidence indicates that SR proteins are directly involved in the process of carcinogenesis, acting as proto-oncogenes [25,30] or regulating splicing and activity of proto-oncogenes [29], tumor suppressors [25] or apoptotic regulators [30]. However to date, only a few studies have investigated the status of these proteins and their regulators *in situ* in human tumors. In this study, we provide the first evidence that SRSF1, SRSF2, P-SRSF2, as well as the SR-phosphorylating kinases SRPK1 and SRPK2 are up-regulated in NSCLC. These data therefore indicate that a global deregulation of critical splicing regulators likely contributes to lung tumorigenesis.

Upregulation of SRSF1 and SRSF2 proteins has been shown in a large variety of carcinoma, including renal, breast, ovarian, cervical, colon and pancreatic cancers [30–36]. By contrast, the status of SRPK1 or SRPK2 remains poorly investigated in human tumors [37–39]. Recently, Montuenga's group reported that SRSF1 is overexpressed in lung adenocarcinoma in which it controls the expression of survivin, an anti-apoptotic protein [26]. Here, we demonstrate that not only SRSF1 but also SRSF2, SRPK1 and SRPK2 proteins are overexpressed in both adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma. Nuclear localization of SR proteins is required for their splicing activity and is dependent on their phosphorylation by SR kinases [28,40]. Unfortunately, we could not investigate the phosphorylated status of SRSF1 due to the lack of a specific antibody directed against phospho-SRSF1. However, we found a strong correlation between SRSF2 and P-SRSF2 IHC scores in both ADC ($p < 0.0001$) and SCC ($p = 0.02$), supporting the notion that SRSF2 mainly accumulates under an hyper-phosphorylated form in lung tumors,

Table 3. Immunohistochemical analysis of SRPK1 and SRPK2 proteins expression in non-small cell lung cancer according to histological subtype.

	SRPK1 expression			SRPK2 expression			P value
	Class 0	Class 1	Class 2	Class 0	Class 1	Class 2	
ADC (%)	2(4)	24(44)	28(52)	3(6)	33(61)	18(33)	<0.0001
SCC (%)	15(28)	16(30)	22(42)	17(32)	19(36)	17(32)	<0.0001
NSCLC (%)	17(16)	40(37)	50(47)	20(19)	52(48)	35(33)	<0.0001

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; NSCLC, non-small cell lung carcinoma. Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0–100%) by the level of intensity (1–3). According to this, tumor samples were grouped into three classes (see 'Materials and methods' section): class 0 (normal expression, as compared to normal lung), class 1 (moderate overexpression) and class 2 (high overexpression). Statistical analysis was done using Fisher's exact test.
doi:10.1371/journal.pone.0046539.t003

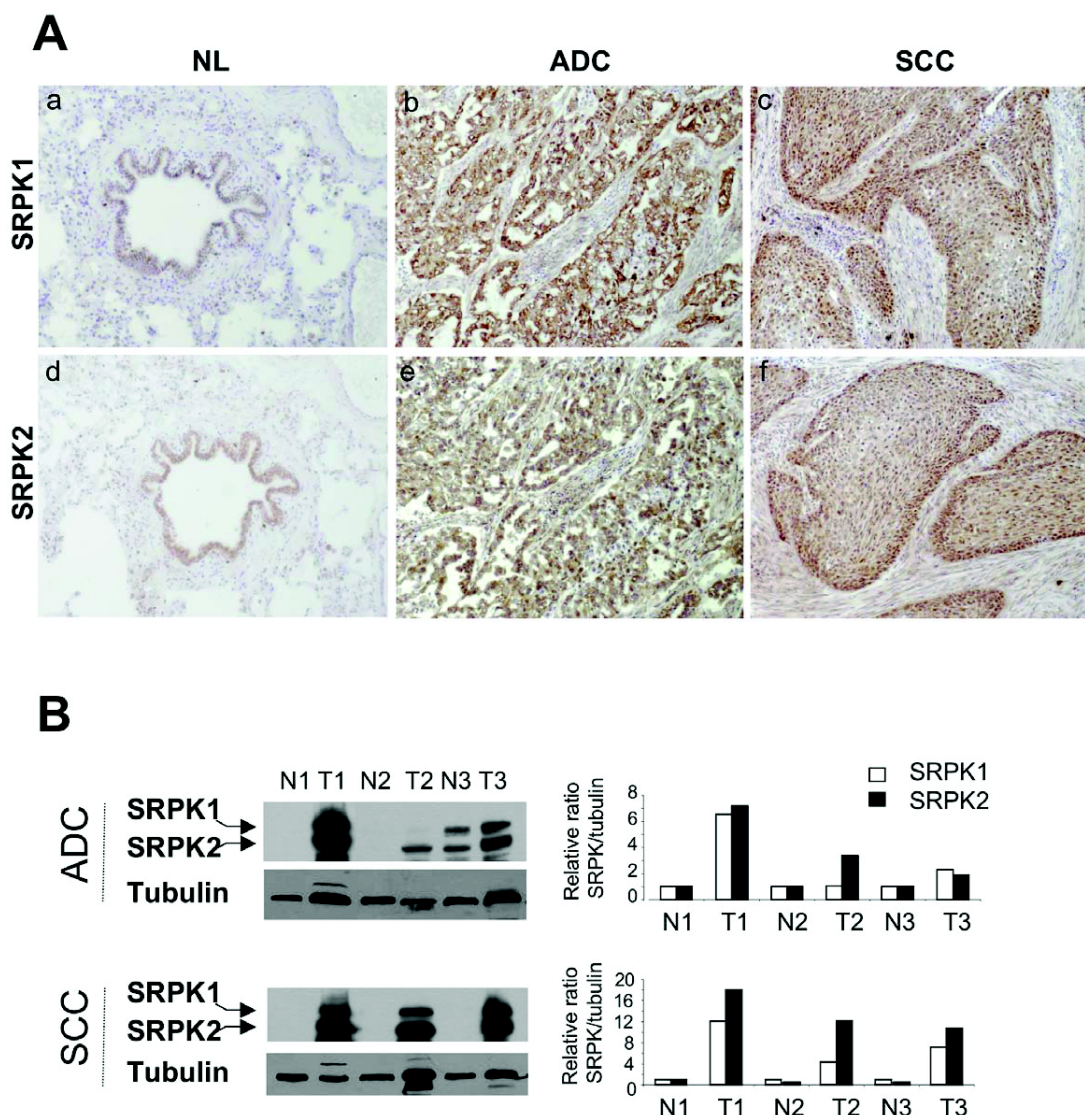


Figure 5. Expression of SRPK1 and SRPK2 proteins in NSCLCs. A, Representative immunostaining from frozen section of normal lung parenchyma and lung cancer tissue with anti SRPK1 (a, b, c) and anti SRPK2 (d, e, f) antibodies [(a, d) normal lung; (b, e) ADC; (c, f) SCC; immunoperoxidase and haematoxylin counterstaining]. B, Left panels: Representative western blots illustrating overexpression of SRPK1 and SRPK2 in lung tumors compared with their matched normal lung tissues. (NL, normal lung; ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma). Right panels: Densitometric analysis of western blot experiment was performed using Image J software. Each signal was quantified and the SRPK1/2:tubulin ratio was calculated in each case. The value 1 was arbitrarily assigned to the ratio obtained in normal tissues and a relative ratio was calculated for each tumor sample according to its normal tissue pair. doi:10.1371/journal.pone.0046539.g005

especially in ADC. In addition, we showed that P-SRSF2 and SRPK2 are directly correlated, suggesting that SRPK2 is the main kinase phosphorylating SRSF2 in this histological sub-type. These data are consistent with our previous study demonstrating that SRPK1 and SRPK2 control SRSF2 phosphorylation in cellular models derived from ADC [10]. However, we cannot exclude the possibility that other SR kinase(s) such as Clk/Sty also contribute to SRSF2 phosphorylation in NSCLCs. We also observed that SRSF1 mainly accumulates in the nucleus of lung tumor cells. Since SRSF1 has been shown to continuously shuttle between the nucleus and the cytoplasm, its nuclear accumulation could reflect its mislocalisation and/or deregulated activity in lung tumors. In agreement with such a notion, very recently the nuclear functions of SRSF1 were shown to be involved in the transformation of

mammary epithelial cells in cooperation with the myc oncogene [30]. Overall, our results support the idea that variations in expression, localization and/or activity (through phosphorylation) of SRSF1 and SRSF2 proteins take place during lung cancer progression. Interestingly, and despite high IHC scores, we did not observe a correlation between *SRSF1*, *SRSF2*, *SRPK1* and *SRPK2* mRNA and protein levels in the vast majority of tumors compared to normal lung tissues. These results indicate that post-transcriptional regulations merely account for the accumulation of SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 proteins in NSCLCs.

ADC and SCC are distinct entities in terms of gene expression, tumor response to therapy or clinical outcome [41–43]. In this study, we do not observe a relationship between SRSF1, SRSF2, P-SRSF2 status and clinico-pathological parameters in SCC,

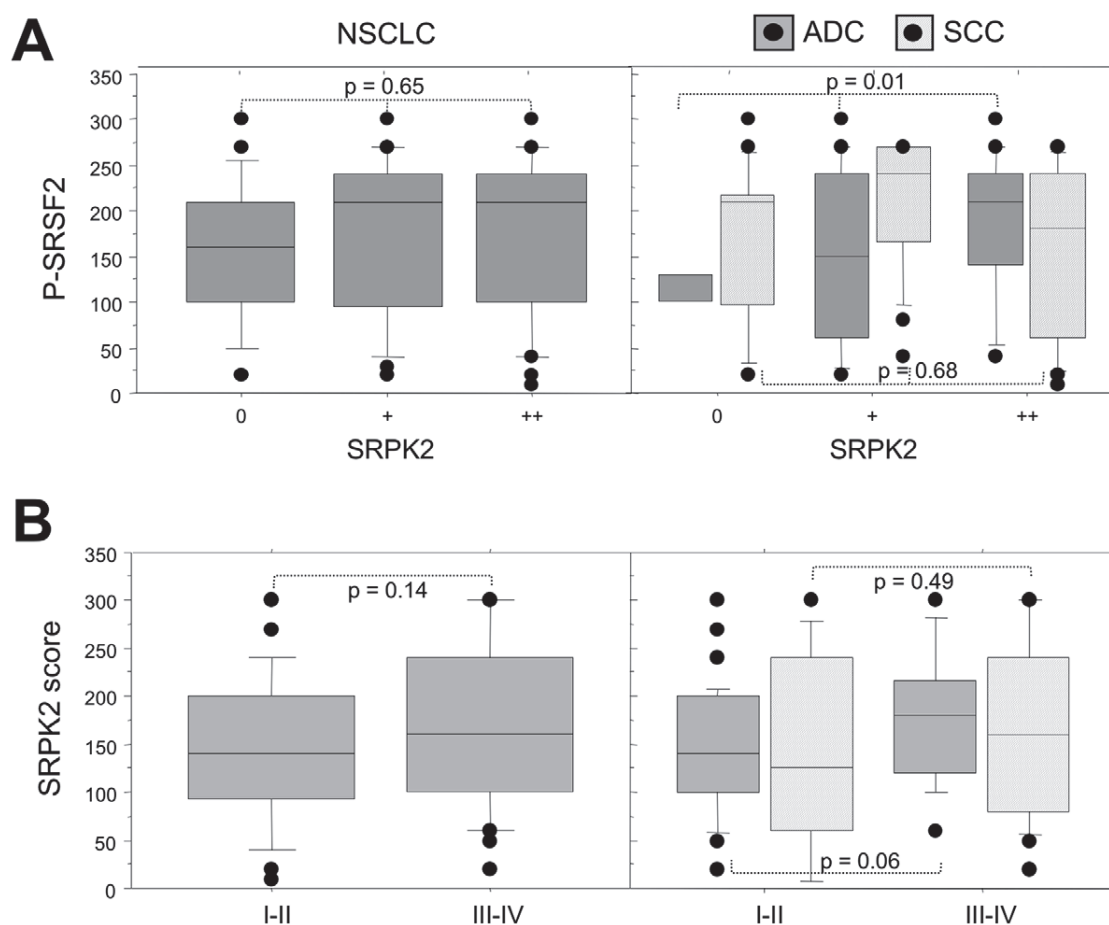


Figure 6. Relationship between SRPK2 protein expression and phospho-SRSF2 status in NSCLC subtypes. A, Distribution of phospho-SRSF2 scores in tumors displaying normal (class 0), moderate (class +) or overexpression (class ++) of SRPK2, in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). B, Distribution of SRPK2 scores according to the tumor stage, in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). Statistical analysis was done using Mann-Whitney's U test. doi:10.1371/journal.pone.0046539.g006

although these proteins are highly overexpressed. In contrast, we demonstrate that high levels of P-SRSF2 correlate with larger tumor size and extensive stage in ADC. Therefore, maintenance of SRSF2 in an hyper-phosphorylated form could lead to a more aggressive phenotype in this histological sub-type. This is consistent with the role of SRSF2 in cell proliferation during mammalian organogenesis [44]. However, we recently demonstrated that SRSF2 is required for cisplatin-induced apoptosis in human lung cell lines derived from ADC [10] and showed that SRSF2 overexpression *per se* induces apoptosis (Moysan E, unpublished data). It is thus tempting to speculate that NSCLCs have counteracted this SRSF2-dependent apoptosis. We also show that high levels of SRSF1 are associated with extensive stage in ADC ($p = 0.004$; Figure S3), suggesting that SRSF1 has a potential role during the metastatic progression of ADC. In agreement with such hypothesis, we demonstrate that H358 adenocarcinoma cells overexpressing SRSF1 acquire a more invasive phenotype as illustrated by hyperactivation of the oncogenic AKT and ERK signaling pathways, increased capacity to form colony in soft agar and acquisition of mesenchymal markers such as vimentin and N-cadherin. It was previously shown in mammary and gastric carcinoma cell lines that overexpression of SRSF1 activates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and induces a more

invasive phenotype [31,45]. Therefore, our data extend to lung carcinoma the aggressive property of SRSF1 protein. We also demonstrate that SRSF1 overexpression decreases the sensitivity of H358 cells to carboplatin and paclitaxel, two chemotherapeutic agents widely used in clinic. It was recently shown that increased EMT markers expression in tumor specimens obtained from patients with NSCLC correlates with reduced sensitivity to cisplatin and paclitaxel [29]. Taken together, these data indicate that SRSF1-induced EMT plays a role in the resistance to chemotherapy. We recently provided evidence that SRSF2 accumulates in NSCLC cell lines treated with cisplatin and is required for induction of apoptosis in this setting [10]. Therefore, SRSF1 and SRSF2 proteins appear to play opposite roles during the response of NSCLC to genotoxic stresses.

In summary, we provide evidence that high scores of SRSF1, SRSF2, and P-SRSF2 proteins correlate with more aggressive features in ADC but not in SCC, thereby suggesting that these proteins do not predict same outcome in both histological subtypes. In addition, we demonstrate for the first time that the SR phosphorylating kinases SRPK1 and SRPK2 are up-regulated in NSCLC. Additional studies are now required to better characterize at which step of the lung carcinogenesis process the deregulation of SR and SRPK proteins occurs, to elucidate the

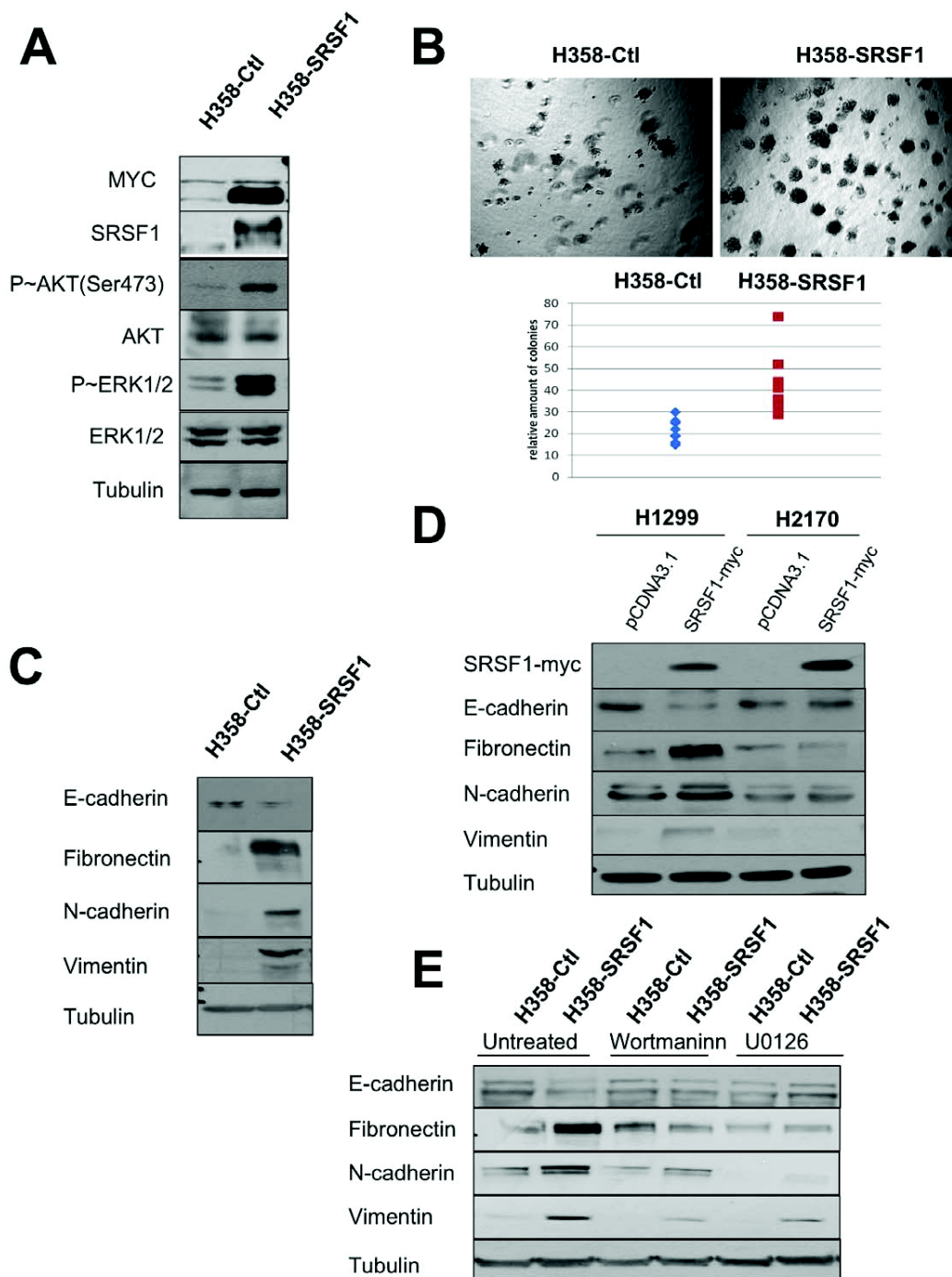


Figure 7. SRSF1 overexpression confers a more aggressive phenotype. Western blot analyses (A, C, E) and soft agar assays (B) were performed in H358-Ctl and H358-SRSF1 cells that were cultured at the same passage. (A) Expression of SRSF1 and activation of AKT/ERK signaling pathways were analyzed by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) Upper panels: representative images of colonies in soft agar. Magnification, $\times 500$. Lower panel: relative amounts of colonies in eight representative fields. Three independent experiments were performed in quadruplicate. (C) Western blot analysis of epithelial and mesenchymal markers. Tubulin was used as a loading control. (D) H1299 and H2170 cells were transfected either with control pcDNA3.1 or with myc-tagged SRSF1 plasmid. Transfected cells were selected during 6 days with G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and western blot analyses were performed using the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. (E) H358-Ctl and H358-SRSF1 cells were cultured for 72 hours in the presence or absence of 500 nM wortmaninn or 10 μM U0126 as indicated. Expression of epithelial (E-cadherin) and mesenchymal (fibronectin, N-cadherin, vimentin) markers was analyzed by western blotting. Tubulin was used as a loading control. doi:10.1371/journal.pone.0046539.g007

regulatory pathways that control their expression and activation, and to identify some of their target genes. We recently showed that

inhibition of SRPK1 enhances sensitivity of lung cancer cell lines to cisplatin [10]. It has also been reported that the knock-down of

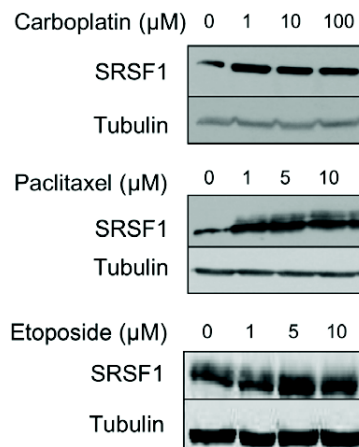
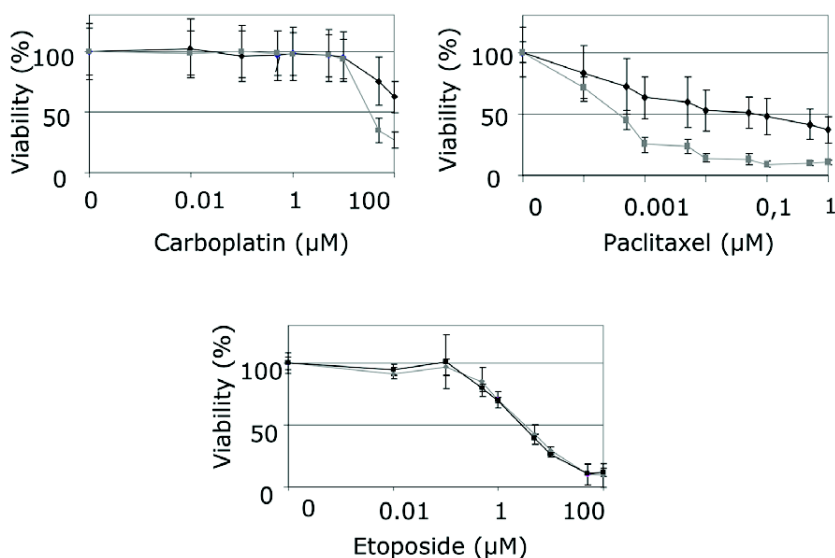
A**B**

Figure 8. SRSF1 overexpression increases resistance to carboplatin and paclitaxel. (A) H358 cells were treated for 24 hours with increasing amounts of etoposide, carboplatin or paclitaxel as indicated. SRSF1 protein level was analyzed by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) 96-hours cell viability assays were performed in H358-Ctrl cells (grey symbols) or H358-SRSF1 clones (black symbols) treated or not with increasing amounts of carboplatin, paclitaxel or etoposide. Results are expressed as the percentage of survival cells compared to untreated cells. Mean value of three independent experiments \pm standard deviation performed in triplicate are presented. doi:10.1371/journal.pone.0046539.g008

SRPK1 in pancreatic carcinoma increases sensitivity to gemcitabine and cisplatin [37,38]. As overexpression of SRPK appears as a typical feature of lung tumor cells, these results open a promising potential for SRPK inhibitors as anti-cancer agents. In the future, pharmacological treatments that target aberrant pre-mRNA splicing will lead to the development of new anti-cancer therapeutic strategies.

Supporting Information

Figure S1 Distribution of SRSF1, SRSF2, Phospho-SRSF2, SRPK1 and SRPK2 stainings across 54 ADC and 53 SCC samples. (ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma). (TIF)

Figure S2 mRNA levels of SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in normal lung and NSCLC. RT-qPCR analysis of mRNA levels in 25 NSCLC and associated normal lung parenchyma samples. GAPDH was used as an internal control.

Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of target gene to GAPDH gene (reference gene), thus normalizing the expression of target gene for sample to sample differences in RNA input. For each couple normal/tumor couple, the mRNA level obtained in normal lung was arbitrarily assigned the value of 1.

(TIF)

Figure S3 SRSF1 expression according to pTNM stages in NSCLC. Distribution of SRSF1 scores in all the tumors (left panels, NSCLC) and in histological subtypes (right panels, ADC and SCC). Statistical analysis was done using Kruskal-Wallis test. (TIF)

Figure S4 Western blot analysis of P-SRSF2 protein expression in H358 cells overexpressing SRSF2 (A) or SRSF1 (B) protein. A. SRSF2 and its phosphorylated form are overexpressed in H358 cells stably transfected with a Tet-responsive SRSF2 vector and cultured in the presence (+) or absence (−) of 1 µg/ml doxycyclin. The results obtained with two

different clones are presented. B. The anti-phospho SRSF2 antibody used in IHC does not recognize SRSF1 protein even when overexpressed in stable H358 clone transfected with a SRSF1 encoding vector. Tubulin was used as a loading control. (TIF)

Acknowledgments

We thank Corinne Cadet and Floriane Albert for technical assistance. We thank Aurélien Vesin for help with statistical analyses, We thank Laurence David-Boudet and Adrien Mombrun for IHC performance. We thank Denis Moro-Sibilot and Philippe Lorimier for Tumor bank gestion and data retrieving.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: S. Gout EB AB RD SL BE. Performed the experiments: S. Gout EB AB RD BE. Analyzed the data: S. Gout BE. Contributed reagents/materials/analysis tools: EB SL. Wrote the paper: S. Gout EB SL S. Gazzeri BE.

References

- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebukova I, Zhang L, et al. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 456: 470–476.
- Srebrow A, Kornblihtt AR (2006) The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*. 119: 2635–2641.
- Venables JP (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*. 64: 7647–7654.
- Brinkman BM (2004) Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*. 37: 584–94.
- Xi L, Feber A, Gupta V, Wu M, Bergemann AD, et al. (2008) Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic Acids Res*. 36: 6535–6547.
- Misquitta-Ali CM, Cheng E, O'Hanlon D, Liu N, McGlade CJ, et al. (2011) Global profiling and molecular characterization of alternative splicing events misregulated in lung cancer. *Mol Cell Biol*. 31: 138–150.
- Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, et al. (2006) E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ*. 13: 260–272.
- Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van den Broeck A, Corcos L, et al. (2008) E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ*. 15: 1815–1823.
- Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, et al. (2010) The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene*. 29: 5392–5403.
- Edmond V, Moysan E, Khochbin S, Matthias P, Brambilla C, et al. (2011) Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J*. 30: 510–523.
- Groeger AM, Esposito V, De Luca A, Cassandro R, Tonini G, et al. (2004) Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology*. 44: 54–63.
- Hirata T, Fukuse T, Naiki H, Hitomi S, Wada H (1998) Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res*. 58: 1108–1110.
- Evans SC, Viswanathan M, Grier JD, Narayana M, El-Naggar AK, et al. (2001) An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene*. 20: 4041–4049.
- Pio R, Montuenga LM (2009) Alternative splicing in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 4: 674–678.
- Kim E, Goren A, Ast G (2008) Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends Genet*. 24: 7–10.
- Hastings ML, Krainer AR (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol*. 13: 302–309.
- Long JC, Caceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*. 417: 15–27.
- Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, Roth MB (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*. 6: 837–847.
- Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*. 75: 1061–1070.
- Xiao SH, Manley JL (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J*. 17: 6359–6367.
- Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*. 369: 678–82.
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, et al. (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J*. 15: 265–275.
- Ko TK, Kelly E, Pines J (2001) CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *J Cell Sci*. 114: 2591–2603.
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, et al. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol*. 12: 1037–1044.
- Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, et al. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*. 14: 185–193.
- Ezponda T, Pajares MJ, Agorreta J, Echeveste JL, Lopez-Picazo JM, et al. (2010) The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression. *Clin Cancer Res*. 16: 4113–4125.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hemerlink HK, Harris CC (2004) World Health Organization classification of tumours. Pathology and Genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press: Lyon 2004.
- Caceres JF, Screaton GR and Krainer AR (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*. 12: 55–66.
- Shintani Y, Okimura A, Sato K, Nakagiri T, Kadota Y, et al. (2011) Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 92: 1794–1804.
- Anczukow O, Rosenberg AZ, Akerman M, Das S, Zhan L, et al. (2012) The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol*. 19: 220–228.
- Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, et al. (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell*. 20: 881–890.
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 19: 1–13.
- Piekielko-Witkowska A, Wiszomirska H, Wojcicka A, Poplawski P, Boguslawska J, et al. (2010) Disturbed expression of splicing factors in renal cancer affects alternative splicing of apoptosis regulators, oncogenes, and tumor suppressors. *PLoS Onc*. 5: e13690.
- Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM (1999) Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene*. 18: 3574–3582.
- Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, Watermann DO, Kieback DG, et al. (2004) Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep*. 11: 1085–1090.
- Mole S, McFarlane M, Chuen-Im T, Milligan SG, Millan D, et al. (2009) RNA splicing factors regulated by HPV16 during cervical tumour progression. *J Pathol*. 219: 383–391.
- Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ (2006) Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 66: 3819–3827.
- Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ (2007) Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 67: 2072–2080.
- Jang SW, Yang SJ, Ehlen A, Dong S, Khoury H, et al. (2008) Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res*. 68: 4559–4570.

40. Caceres JF, Misteli T, Screaton GR, Spector DL, Krainer AR (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol.* 138: 225–238.
41. Neal JW (2010) Histology matters: individualizing treatment in non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 15: 3–5.
42. Wheatley-Price P, Blackhall F, Lee SM, Ma C, Ashcroft L, et al. (2010) The influence of sex and histology on outcomes in non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of five randomized trials. *Ann Oncol.* 21: 2023–2028.
43. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC (2010) The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 28: 5311–5320.
44. Xiao R, Sun Y, Ding JH, Lin S, Rose DW, et al. (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol.* 27: 5393–5402.
45. Ghigna C, De Toledo M, Bonomi S, Valacca C, Gallo S, et al. (2010) Pro-metastatic splicing of Ron proto-oncogene mRNA can be reversed: therapeutic potential of bifunctional oligonucleotides and indole derivatives. *RNA Biol.* 7: 495–503.

ANNEXE 3

Chapter 21 1

VEGF-A Splice Variants: Do They Play a Role 2

in Tumor Responses to Anti-angiogenic 3

Therapies? 4

Beatrice Eymin, Asma Boudria, and Cherine Abou-Faycal 5

Abstract It has been known for two decades that *VEGF-A* encodes several 6
VEGF-A splice variants, which are termed VEGF_{xxx}, according to the total num- 7
ber of amino acids in the mature protein. To date, nine VEGF_{xxx} isoforms have 8
been described, displaying different biodistributions and pro-angiogenic activi- 9
ties. Adding another level of complexity to VEGF-A biology, a new family of 10
VEGF-A isoforms, termed VEGF_{xxx}b, which exert anti-angiogenic functions, was 11
discovered in 2002 and only differs from VEGF_{xxx} polypeptides with regard 12
[AU1] to their C-terminal six amino acids. Therefore, reminiscent of what is observed, 13
for instance, during apoptosis, the alternative splicing of *VEGF-A* pre-mRNA 14
generates two types of isoforms with antagonistic biological functions. As anti- 15
angiogenic therapies target both the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b families, *VEGF-A* 16
pre-mRNA splicing may therefore impact tumor responses to these therapies. 17
Consistently, recent clinical studies have highlighted VEGF-A splice variants as 18
predictive biomarkers in response to bevacizumab. Hence, identification of the 19
upstream signaling pathways that control *VEGF-A* pre-mRNA splicing, better 20
characterization of the specific biological functions played by each VEGF-A 21
splice variant, and analysis of the impact of anti-angiogenic therapies on *VEGF-A* 22
pre-mRNA splicing are critical goals. The purpose of this chapter is to summarize 23
the current knowledge in this field. 24

B. Eymin (✉) • A. Boudria • C. Abou-Faycal
INSERM U823, Team 2 Molecular Basis of Lung Cancer Progression,
Institute Albert Bonniot, Grenoble, France
e-mail: beatrice.eymin@ujf-grenoble.fr

J.-J. Feige et al. (eds.), *Molecular Mechanisms of Angiogenesis*,
DOI 10.1007/978-2-8178-0466-8_21, © Springer-Verlag France 2014

21.1 Proteome Diversity Through Pre-mRNA Alternative Splicing: *VEGF-A* Does Not Escape the Rule

Deep sequencing of the human transcriptome has provided evidence that up to 90 % of human multi-exon genes undergo pre-mRNA alternative splicing (AS) (Pan et al. 2008), and the role of AS in both physiological and pathological processes, such as cancer, is now well documented. For instance, many splice variants have been found to be misregulated in cancers (David and Manley 2010), among them *VEGF-A*-encoded splice variants.

21.1.1 The *VEGF_{xxx}* Family

21.1.1.1 General Presentation

The human *VEGF-A* gene is located on chromosome 6 at 6p21.3 and spans 14 kb, with eight exons separated by seven introns (Vincenti et al. 1996) (Fig. 21.1). Two years after its discovery, *VEGF-A* was found to encode multiple protein isoforms

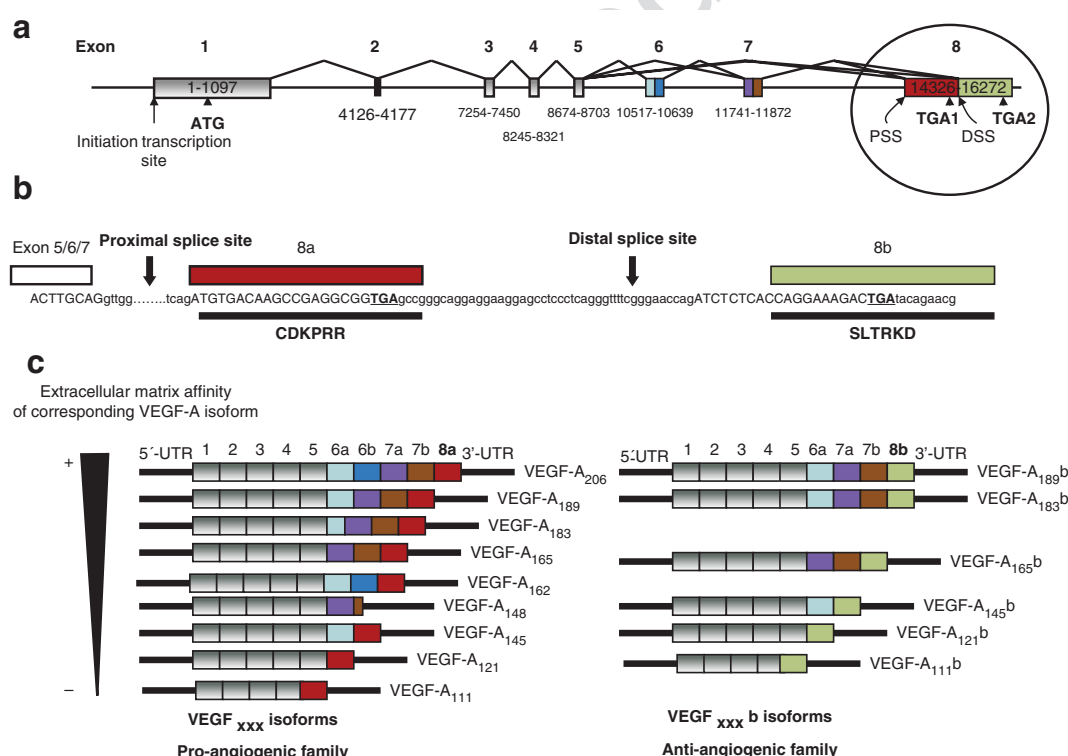


Fig. 21.1 (a) The human *VEGF-A* gene structure, consisting of eight exons and seven introns. (b) Focus on the C-terminal exon 8 of *VEGF-A*, the splicing of which generates either the VEGF_{xxx} or VEGF_{xxx}b subfamily. The proximal splice site (PSS) and distal splice site (DSS) are indicated. The nucleotide and amino acid sequences for exons 8a and 8b are depicted. (c) Illustration of all VEGF-A splice variants in each subfamily. The extracellular matrix affinity of the corresponding VEGF-A isoforms is indicated

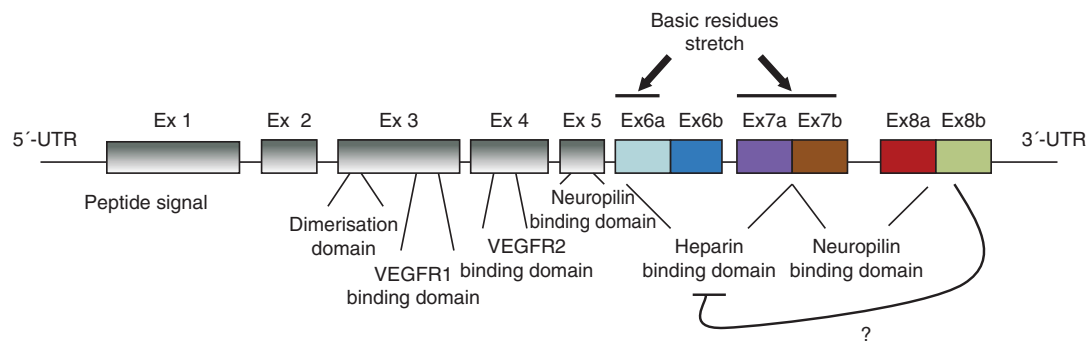


Fig. 21.2 Scheme of the functional domains of the VEGF-A protein encoded by each exon. The basic residues that confer affinity to heparin-containing proteoglycans are indicated. Because VEGF_{165b} does not bind heparin, it has been proposed that exon 8b could exert a negative effect on heparin binding. Alternatively, exon 8a is required for heparin binding. Exons 3 and 4 encode VEGFR1 and VEGFR2 binding domains. Exons 5, 7, and 8a encode sequences that are required for VEGF-A binding to neuropilins. As a consequence, VEGF_{xxx}b isoforms do not bind neuropilins

through exonic alternative splicing (Houck et al. 1991). To date, nine human VEGF-A splice variants, termed VEGF_{xxx} (where xxx represents the total number of amino acids in the mature protein after signal sequence cleavage), have been described: VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, and VEGF₂₀₆ (Ferrara 2004). At the structural level (Fig. 21.1), with the exception of VEGF₁₁₁ (containing exons 1–4), all VEGF_{xxx} isoforms contain exons 1–5 and differ only by the inclusion/exclusion of exon 6a, 6b, or 7. Hence, VEGF₁₈₉ lacks the residues encoded by exon 6b, VEGF₁₆₅ those encoded by exon 6, and VEGF₁₂₁ those encoded by exons 6 and 7. Exons 6a and 7 encode highly conserved sequences that are rich in basic residues that confer an affinity for heparin-containing proteoglycans (Fig. 21.2). Therefore, VEGF₁₂₁ is an acidic protein that does not bind heparin and is highly diffusible, whereas the VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₉, VEGF₁₈₃, VEGF₁₆₂, and VEGF₁₄₅ isoforms tightly bind to the heparan sulfate that is present at the cell surface and extracellular matrix (ECM) (Houck et al. 1992). The VEGF₁₆₅ isoform displays an intermediate pattern, as it contains only 15 basic amino acids within the 44 residues encoded by exon 7, and it is estimated that approximately 50–70 % of the VEGF₁₆₅ pool is anchored at the cell surface or ECM (Houck et al. 1992). The VEGF-A isoforms in the ECM constitute a reservoir of growth factor that can be slowly released after exposure to heparin, heparan sulfate, and heparinases or more rapidly mobilized by specific proteolytic enzymes, such as plasmin and urokinase-type plasminogen activator (uPA) (Plouet et al. 1997). Importantly, the loss of the heparin-binding domain after proteolytic cleavage reduces the mitogenic activity of VEGF-A (Keyt et al. 1996). Therefore, VEGF-A pre-mRNA splicing controls both the biodistribution and bioactivity of VEGF-A, allowing the establishment of a gradient of VEGF-A during tumor angiogenesis, with the most diffusible isoform acting at distance to promote vascular recruitment, whereas the matrix-bound isoforms promote the local expansion of capillary beds (Grunstein et al. 2000).

All VEGF-A isoforms are secreted as antiparallel homodimers covalently linked by two disulfide bridges between Cys-51 and Cys-60 (Muller et al. 1997). At the structural level, all isoforms possess a dimerization domain and a VEGFR1 or

VEGFR2 binding domain (Fig. 21.2). However, the isoforms display different binding affinities for the VEGF receptors, VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (KDR/Flk-1), and for their co-receptors, neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2) (Roskoski 2007). Hence, VEGF₁₆₅ binds to VEGFR1 and VEGFR2, whereas VEGF₁₈₉ preferentially binds to VEGFR1 unless cleaved by proteases. VEGF₁₂₁ exhibits a modestly reduced affinity for VEGFR1 and VEGFR2 in the presence of heparin when compared with VEGF₁₆₅. Although all VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₂₁ isoforms are able to bind NRP1 (Delcombel et al. 2013), only VEGF₁₆₅ bridges the formation of VEGFR2/NRP1 ternary complexes (Soker et al. 2002), whereas VEGFR2 enhances the interaction between NRP1 and VEGF₁₆₅ only (Pan et al. 2007a). Therefore, as compared with the other VEGF_{xxx} isoforms, VEGF₁₆₅ displays optimal features in terms of biological potency. Indeed, VEGF₁₆₅ is the only isoform that can fully rescue the tumorigenic phenotype in mouse VEGF^{-/-} cells (Grunstein et al. 2000). Interestingly, matrix-bound VEGF₁₆₅, but not soluble VEGF₁₆₅, is able to trigger a sustained phosphorylation of VEGFR2 in endothelial cells, followed by a specific activation of the p38 MAPK pathway (Chen et al. 2010). These data suggest that VEGF_{xxx} isoforms transactivate specific downstream VEGFR-dependent signaling pathways depending on their ECM-binding ability.

21.1.1.2 VEGF_{xxx} Isoforms: Distinct Functions and Pattern of Expression in Tumors

As determined by the cDNA analysis of a variety of cell types and tissues and tumor specimens, most VEGF-producing cells appear to preferentially express VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉ mRNAs, with VEGF₁₆₅ being the predominant isoform. VEGF₁₂₁ mRNA is abundant in the lung and kidney, and VEGF₁₈₉ mRNA is highly expressed in cardiac and vascular tissues, albeit to a lesser extent than VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ (Zygalaki et al. 2008). VEGF₁₈₉ mRNA is preferentially expressed under conditions of increased stretch-induced cell tension and is thought to play a role in vascularization during bone repair (Faure et al. 2008). VEGF₁₈₃ also has a wide tissue distribution and may have avoided earlier detection through confusion with VEGF₁₈₉ (Jingjing et al. 1999). By contrast, VEGF₁₄₅ and VEGF₂₀₆ mRNAs are rarely expressed and are seemingly restricted to cells of placental origin (Cheung et al. 1995).

In tumors, RT-PCR or RT-QPCR analyses have further revealed differential patterns of VEGF_{xxx} expression and have correlated this pattern with clinicopathological features. In lung and colon carcinomas, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ mRNAs appear to be the most predominant transcripts (Zygalaki et al. 2007). VEGF₁₆₅ mRNA expression in many tumor types has been associated with progression, invasion and metastasis, microvessel density, decreased survival rate, and a poor prognosis. In colon, renal cell, and lung carcinomas, the expression of VEGF₁₈₉ mRNA was associated with a worse prognosis (Ohta et al. 1996), and only VEGF₁₈₉ mRNA expression was found to be an independent prognostic indicator in a series of 130 non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) (Matsuyama et al. 2009). VEGF₁₈₉ was also found to be necessary for the growth of NSCLC xenografts in vivo,

with VEGF₁₈₉-overexpressing tumors being larger and displaying higher vessel per- 110
fusion and permeability than those overexpressing either VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (Yuan 111
et al. 2001). However, in lung cancer, high levels of VEGF₁₂₁ mRNA have also been 112
associated with a poor prognosis and lymph node metastasis (Oshika et al. 1998), 113
and VEGF₁₂₁ was found to promote lymphangiogenesis via the secretion of VEGF-C 114
(Kawai et al. 2008). In addition, expression of VEGF₁₂₁ mRNA was associated with 115
the tumor progression of bladder and renal cell carcinoma (Li et al. 2000; Ljungberg 116
et al. 2003) and with a worse prognosis in acute myeloid leukemia (Mourah et al. 117
2009), and the VEGF₁₂₁ isoform was found to be the most tumorigenic in prostate 118
and breast cancers (Catena et al. 2007). In 2007, it was reported that VEGF₁₁₁ mRNA 119
was expressed in various tumor cell lines following treatment with such genotoxic 120
agents as UV-B, camptothecin, and mitomycin C (Mineur et al. 2007). 121

Altogether, these data demonstrate that VEGF-A pre-mRNA splicing likely 122
contributes to tumorigenesis by providing another way to finely regulate VEGF-A 123
bioactivity in addition to the activation of VEGF-A transcription. Such a notion is 124
fully consistent with the data of Tozer and colleagues, which provided evidence that 125
mouse fibrosarcoma cells that express only a single isoform of VEGF_{xxx} produce 126
tumors with different vascularization patterns, vessel wall structure, and barrier 127
function (Tozer et al. 2008). 128

21.1.2 The VEGF_{xxx}b Family: Six Amino Acids 129 That Make the Difference 130

21.1.2.1 General Presentation 131

In 2002, a new family of VEGF-A splice variants, termed VEGF_{xxx}b, was discov- 132
ered (Bates et al. 2002). VEGF_{xxx}b splice variants share 94–98 % homology with 133
VEGF_{xxx} and result from the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final 134
exon 8 of VEGF-A (Fig. 21.1). Hence, the use of a proximal splice site (PSS) in 135
exon 8 leads to the inclusion of exon 8a and generates the VEGF_{xxx} family, whereas 136
the use of a distal splice site (DSS) located 66 nucleotides further downstream from 137
PSS allows the inclusion of exon 8b and the generation of VEGF_{xxx}b transcripts. At 138
the protein level, VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms display the same lengths and 139
amino acid sequences and differ only at the level of their C-terminal six amino 140
acids. Indeed, exon 8a in VEGF_{xxx} mRNAs encodes a CDKPRR sequence, whereas 141
exon 8b in VEGF_{xxx}b transcripts encodes an SLTRKD sequence (Ladomery et al. 142
2007). This distinct C-terminal extremity strongly affects the VEGF-A tertiary 143
structure (Cui et al. 2004), as the Cys-160 that forms a disulfide bond with Cys-146 144
in exon 7 is replaced by an aspartic acid residue. In addition, the two highly charged 145
arginine residues of the VEGF_{xxx} proteins are replaced by a lysine and aspartic acid 146
in the VEGF_{xxx}b proteins, with a substitution of a proline by an arginine. As a con- 147
sequence, the VEGF_{xxx}b isoforms retain both the VEGF tyrosine kinase receptor 148
binding and dimerization domains but do not bind neuropilins and are not able to 149

fully activate VEGFR-dependent signaling pathways (Cebe Suarez et al. 2006; Kawamura et al. 2008; Delcombel et al. 2013). Indeed, VEGF₁₆₅b does not exert its effect at full rotation on VEGFR2, which results in the rapid blockage of the ATP binding site, leading to transient and non-efficient VEGFR2 autophosphorylation (Harper and Bates 2008). Thus, although VEGF₁₆₅b is able to stimulate endothelial cell proliferation and subsequent ERK activation under certain conditions, this occurs with less potency than with VEGF₁₆₅ (Catena et al. 2010). In addition, unlike VEGF₁₆₅, which induces VEGFR2 internalization and recycling to the plasma membrane through Rab11 vesicles by a mechanism involving NRP1, VEGF₁₆₅b promotes the accumulation of phospho-VEGFR2 in Rab7 vesicles, which is indicative of receptor degradation (Ballmer-Hofer et al. 2011). At the biological level, in in vitro endothelial proliferation and migration assays, ex vivo isolated resistance vessel myographs, and in vivo neovascular and tumor growth models, VEGF₁₆₅b acts as a dominant negative isoform that specifically competes with and inhibits VEGF₁₆₅ effects on endothelial cell proliferation, migration, and vasodilatation, thereby inhibiting angiogenesis and tumor growth (Bates et al. 2002; Woolard et al. 2004; Rennel et al. 2008). VEGF₁₂₁b also inhibits the migration of endothelial cells and reduces xenografted tumor growth through a direct effect on endothelial cells (Rennel et al. 2009). Interestingly, VEGF₁₆₅b failed to bind heparin despite possessing exon 7 (Delcombel et al. 2013), implicating exon 8a or an inhibitory function of exon 8b in this interaction. Therefore, as compared with VEGF_{xxx}, VEGF_{xxx}b isoforms could also possess distinct bioavailability.

21.1.2.2 VEGF_{xxx}b Isoforms: Do They Exhibit a Differential Pattern of Expression in Tumors?

VEGF₁₆₅b mRNA was the first VEGF_{xxx}b mRNA identified by RT-PCR in kidney cortex tissue (Bates et al. 2002). Subsequently, VEGF₁₂₁b (Rennel et al. 2009), VEGF₁₄₅b (Perrin et al. 2005), and VEGF₁₈₉b mRNAs (Miller-Kasprzak and Jagodzinski 2008) were identified in various human tissues. Indeed, VEGF_{xxx}b isoforms are thought to form over 50 % of the total VEGF-A protein in normal, non-angiogenic tissues, such as the dorsal root ganglia (71 %), lung (82 %), colon (>95 %), skin (>95 %) (Qiu et al. 2009), and vitreous (66 %) (Perrin et al. 2005). By contrast, VEGF_{xxx}b represents a small proportion of total VEGF-A in placenta (1.4 %) (Bates et al. 2006). Importantly, although VEGF_{xxx} isoforms are overexpressed in many tumor types, the VEGF_{xxx}b isoforms appear to be mainly downregulated in several cancers, including melanoma (Pritchard-Jones et al. 2007) and prostate (Woolard et al. 2004), colon (Varey et al. 2008), kidney (Bates et al. 2002), and Wilms' (Amin et al. 2011) carcinomas. In colorectal tumors, the downregulation of VEGF₁₆₅b was associated with advanced stages, vascular invasion, and lymph node metastases (Diaz et al. 2008), and the absence of VEGF_{xxx}b expression was found to predict metastatic spread in melanoma patients (Pritchard-Jones et al. 2007). Moreover, VEGF₁₆₅b expression was downregulated as compared with VEGF₁₆₅ in neuroblastoma, and rhVEGF₁₆₅b was found to reduce neuroblastoma tumor growth rate in established xenografts (Peiris-Pages et al. 2010).

Therefore, a switch between the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms in favor of VEGF_{xxx} exists in human tumors. Regardless, the persistence of VEGF_{xxx}b expression, together with VEGF_{xxx}, has also been reported in tumors. This is indeed the case in 70 % of clear renal cell carcinomas (Grepin et al. 2012) and in breast cancers in which the VEGF_{xxx}b isoforms are upregulated compared to nonmalignant breast tissues (Catena et al. 2010). VEGF₁₆₅b expression was also detected in stromal cells surrounding colorectal cancers and correlated with lower microvessel density (Tayama et al. 2011). Moreover, Bates and colleagues recently showed that a differential pattern of VEGF₁₆₅b protein expression exists in colon carcinoma, with tumors displaying low or high levels as compared with normal tissues (Bates et al. 2012). Accordingly, we observed that approximately 35 and 15 % of NSCLCs display low and high level of VEGF₁₆₅b protein expression, respectively, as compared with normal lung tissues (Boudria et al. in preparation). More interestingly, we found a significant association between high levels of VEGF₁₆₅b and lymph node metastases in NSCLC. Thus, the role of VEGF_{xxx}b isoforms during tumorigenesis might be more complex than previously imagined.

[AU2]

21.1.2.3 Analysis of VEGF-A Splice Isoforms in Tumors: What We Should Keep in Mind

As shown above, the analysis of distinct VEGF_{xxx} isoforms in human tumors has been mainly performed by RT-PCR or RT-QPCR using primers specifically designed to amplify each VEGF_{xxx} splice variant. However, in the vast majority of these studies, these primers were later shown to also co-amplify VEGF_{xxx}b mRNAs. The same is true regarding the analysis of the VEGF_{xxx} protein isoforms. Indeed, the antibodies used in the vast majority of in situ studies are pan-VEGF antibodies that recognize all VEGF-A isoforms, including VEGF_{xxx}b isoforms. Hence, the commercial antibodies previously thought to specifically target VEGF_{xxx} isoforms were later found to cross-react with rhVEGF_{xxx}b proteins. To date, there is no tool for the specific detection of VEGF_{xxx} protein isoforms by Western blotting, as the use of a pan-VEGF antibody will allow the discrimination among VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉ but not between the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms. Nonetheless, mouse monoclonal antibodies directed against the C-terminal nine amino acids of VEGF₁₆₅b (CTRLTRKD) have been developed; one (MVRL56/1), now commercially available, exhibits specificity for the VEGF₁₆₅b isoform versus VEGF₁₆₅ and does not cross-react with VEGF₁₆₅ or VEGF₁₂₁ recombinant proteins (Woolard et al. 2004). Therefore, until tools allowing the specific detection of VEGF_{xxx} isoforms become available, a concomitant analysis of both total VEGF-A (using a pan-VEGF-A antibody) and VEGF_{xxx}b (using the specific MVRL56/1 anti-VEGF_{xxx}b antibody) proteins should be performed before drawing conclusions regarding the status of VEGF-A in tumors. In addition, because VEGF-A is regulated at multiple posttranscriptional levels in addition to pre-mRNA splicing and it is not known whether the mRNA and protein levels are strictly correlated, concomitant analyses of both VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b mRNA and protein levels should also be performed.

[AU3]

21.1.3 Molecular Mechanisms Regulating VEGF-A Pre-mRNA Splicing

Several transcription factors, such as hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), inflammatory cytokines, growth factors, or oncogenes, have been identified as upstream transcriptional activators of *VEGF-A* (Ferrara 2004). By contrast, although *VEGF-A* splice isoforms were described for the first time in 1989, very little is known about the molecular mechanisms that control *VEGF-A* pre-mRNA splicing (Fig. 21.3).

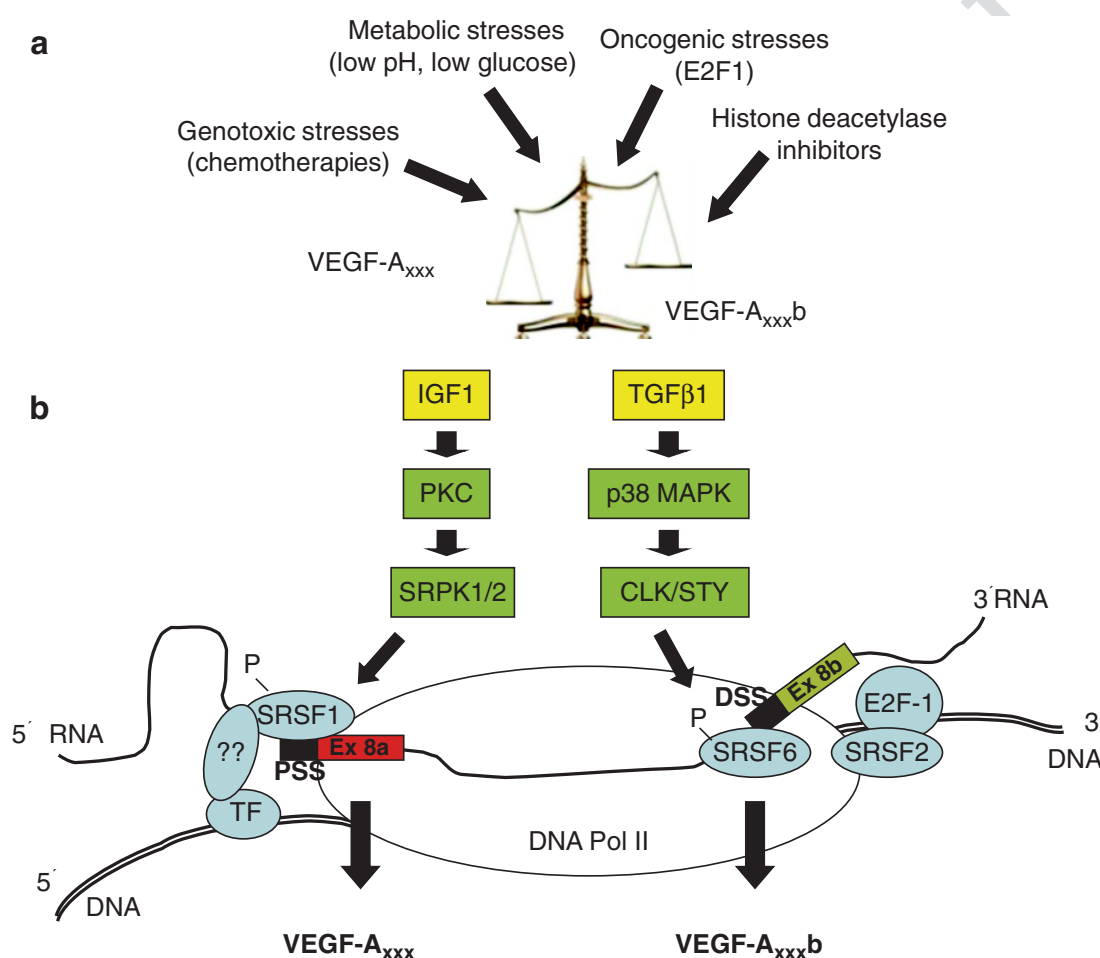


Fig. 21.3 (a) The upstream stimuli that have been shown to modify the balance between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx.b} isoforms. (b) The cellular signaling pathways that affect the choice between the proximal splice site (PSS) and distal splice site (DSS) in exon 8, thereby allowing the expression of either the VEGF_{xxx} or VEGF_{xxx.b} splice variant. The SRSF1 protein favors PSS selection, whereas the SRSF6 or SRSF2 protein favors DSS. The potential link between RNA and DNA machineries is illustrated. In this setting, transcription factors, such as E2F1, could cooperate with SR proteins to control pre-mRNA splicing. In addition, the elongation rate of DNA polymerase II could also affect pre-mRNA splicing. TF transcription factor

21.1.3.1 Molecular Determinants of $VEGF_{xxx}$ Pre-mRNA Splicing 242

It was previously shown that the splicing factor SAM68 (Cohen et al. 2005), 243
the U2AF65-related protein CAPER (Dowhan et al. 2005), and a putative chloride 244
channel, pICn (Li et al. 2004), control $VEGF_{xxx}$ pre-mRNA splicing. Progesterone 245
selectively was reported to increase the expression of the $VEGF_{189}$ isoform in 246
the human uterus (Ancelin et al. 2002). Moreover, an exonic splicing silencing 247
(ESS) sequence was recently described in exon 6a, though the regulatory proteins 248
interacting with it remain unknown (Wang et al. 2009). In endometrial cancer cells, 249
low pH (acidosis) significantly upregulated the $VEGF_{121}$ mRNA level when com- 250
pared with the $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, and $VEGF_{189}$ isoforms through a mechanism 251
involving the p38 MAPK pathway and splicing factors of the SR proteins family, 252
namely, SRSF1 (formerly SF2/ASF), SRp20, and SRp40 (Elias and Dias 2008). 253
In addition, incubation with phorbol myristate acetate (PMA), an activator of 254
PKC activity, induced the expression of $VEGF_{206}$ in human skin mast cells, which 255
normally express the $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, and $VEGF_{189}$ isoforms (Grutzkau 256
et al. 1998). As previously discussed, $VEGF_{111}$ mRNA was specifically induced by 257
genotoxic stress in several tumor cell lines and human xenografts in nude mice upon 258
treatment with camptothecin (Mineur et al. 2007); however, the molecular mecha- 259
nisms involved remain unknown. 260

21.1.3.2 Molecular Pathways That Control the Balance Between 261 $VEGF_{xxx}$ and $VEGF_{xxx}b$ Splice Variants 262

Bates's group has mainly contributed to the identification of upstream regulators 263
of the $VEGF_{xxx}b$ isoforms. In 2008, Nowak and colleagues first demonstrated in 264
primary epithelial cells that insulin growth factor (IGF1) and tumor necrosis factor 265
alpha (TNF- α) treatment favor the selection of the PSS, thereby increasing $VEGF_{xxx}$ 266
production, whereas tumor growth factor beta 1 (TGF- β 1) favors DSS selection, 267
increasing $VEGF_{xxx}b$ (Nowak et al. 2008) (Fig. 21.3). Using epithelial cells overex- 268
pressing various SR proteins, these authors further demonstrated that SRSF1 favors 269
PSS selection by binding a 35-nucleotide sequence of exon 8a upstream of PSS, 270
whereas SRSF6 (formerly SRp55) favors DSS by binding to a 35-nucleotide region 271
of the 3'UTR immediately downstream of the stop codon in exon 8b. TGF- β 1 action 272
requires the activity of p38 MAPK and CLK/STY kinases, whereas IGF1 involves 273
both PKC and SRPK1/2, the latter being the specific kinases of SR proteins (Nowak 274
et al. 2010). Consistent with a crucial role of SR proteins in controlling the balance 275
between $VEGF_{xxx}$ and $VEGF_{xxx}b$ isoforms both under normal and pathological con- 276
ditions, elevated $VEGF_{165}b$ expression was correlated with the increased expression 277
of TGF- β 1 and SRSF6 in keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells, and perivas- 278
cular inflammatory cells of patients suffering from systemic sclerosis (Manetti et al. 279
2011). In addition, we provided the first evidence that the transcription factor E2F1 280
favors $VEGF_{165}b$ expression via a mechanism involving SRSF2 (formerly SC35), 281

another SR protein, in lung adenocarcinoma cell lines and xenografts in nude mice (Merdzhanova et al. 2010). Later, Bates and colleagues showed that mutations in WT1, the Wilms' tumor suppressor gene, suppress VEGF_{165b} expression and cause abnormal gonadogenesis, renal failure, and Wilms' tumors (Amin et al. 2011). In WT1 mutants, SRPK1 was upregulated through the derepression of its transcription, leading to the phosphorylation and nuclear accumulation of SRSF1, thereby favoring VEGF_{xxx} isoforms. Interestingly, sodium butyrate (NaBu), a histone deacetylase inhibitor, increased VEGF_{121b}, VEGF_{165b}, and VEGF_{189b} mRNA and protein levels in immortalized human lung microvascular endothelial cells (HLMECs) (Ciura and Jagodzinski 2010). As we demonstrated that the treatment of human lung adenocarcinoma cell lines with NaBu or cisplatin increased the expression level of SRSF2 (Edmond et al. 2011a, b), it is tempting to speculate that therapies could modify VEGF-A pre-mRNA splicing through the modulation of SR protein expression (see Sect. 21.2.2). In addition, as pre-mRNA splicing is known to occur co-transcriptionally, one might postulate that SR proteins could cooperate with the transcription factors that control VEGF-A transcription to modulate VEGF-A pre-mRNA splicing, as what we found for E2F1 and SRSF2. Whether HIF1 plays a role in this scenario remains a very intriguing question.

21.2 Does VEGF-A Pre-mRNA Splicing Play a Role in the Response to Anti-angiogenic Therapies?

21.2.1 Anti-angiogenic Therapy Failure: Patient Selection Is Critical

One of the main problems with the use of anti-angiogenic therapies is the absence of effective predictive biomarkers. In a meta-analysis of published randomized controlled trials (RCTs), Ranpura and colleagues showed that the addition of bevacizumab is associated with an increased risk of fatal adverse events (FAEs) in patients receiving taxanes or platinum salts compared with chemotherapy alone (Ranpura et al. 2011) and was not restricted to an anti-VEGF antibody. Indeed, another meta-analysis derived from 10 randomized RCTs including 4,679 patients receiving either sorafenib, sunitinib, or pazopanib also found an increased risk of FAEs following the use of these VEGFR TKIs compared with control patients (Schutz et al. 2012). Therefore, biomarkers are urgently needed to select patients that will benefit from such therapies. In addition, a better understanding of the molecular mechanisms involved in primary or acquired tumor resistance to these therapies is crucial in the development of new therapeutic strategies.

21.2.2 *Anti-angiogenic Therapies Used Alone or in Combination Regulate VEGF-A Pre-mRNA Splicing* 319 320

Several clinical studies have shown acute increases or decreases in circulating total VEGF-A levels after bevacizumab delivery (Lambrechts et al. 2013). By contrast, the impact of anti-angiogenic therapies on *VEGF-A* pre-mRNA splicing has not yet been investigated. We recently addressed this question and provided the first evidence that treating human lung adenocarcinoma cell lines with bevacizumab alters the VEGF₁₆₅b/pan-VEGF ratio in favor of VEGF₁₆₅b (Boudria et al. in preparation). Similar results were obtained when SU5416, a VEGFR TKI, was used. Consistent with our data, intravitreal bevacizumab injection in an oxygen-induced retinopathy mouse model also increased the relative protein expression of the VEGF₁₆₅b isoform while inhibiting the protein level of total VEGF-A isoforms (Shi et al. 2013). Although these results must be extended to other tumor types and/or other VEGFR TKIs, such as sorafenib or sunitinib, they demonstrate the impact of anti-angiogenic therapies on *VEGF-A* pre-mRNA splicing.

Bevacizumab is never used alone and is always combined with conventional chemotherapies for the treatment of breast, lung, colon, and kidney carcinomas. However, as it has been shown that chemotherapies increase *VEGF-A* mRNA expression in cancer cells (Fan et al. 2008), it is possible that chemotherapies either used alone or in combination with anti-angiogenic therapies also impact *VEGF-A* pre-mRNA splicing. In NSCLCs, bevacizumab is combined with platinum salts (cisplatin or carboplatin) and with paclitaxel or gemcitabine. Interestingly, we found that treating NSCLC cell lines with these drugs significantly increased the VEGF₁₆₅b protein level, though it decreased the expression of total VEGF-A (Boudria et al. in preparation). More interestingly, when bevacizumab was added to these chemotherapies, a stronger accumulation of VEGF₁₆₅b protein was observed in these cells, and VEGF₁₆₅b prevented cisplatin-induced apoptosis. Therefore, the combination of bevacizumab and cisplatin could select tumor cells that are more resistant to apoptosis through the upregulation of VEGF₁₆₅b. Of note, cells overexpressing VEGF₁₆₅b were also less sensitive to hypoxia-induced apoptosis, thereby suggesting that VEGF₁₆₅b could be a general inhibitor of apoptosis. Our results are consistent with recent data demonstrating that VEGF₁₆₅b exerts a neuroprotective function in hippocampal, cortical, and retinal neurons by activating VEGFR2 and p42/44 MAPK and preventing apoptosis (Beazley-Long et al. 2013).

Therefore, such anti-angiogenic therapies as bevacizumab, alone or in combination with chemotherapies, appear able to control *VEGF-A* pre-mRNA splicing and to favor the expression of VEGF_{xxx}b isoforms, at least in NSCLC cell lines. Such an effect might play a role in tumor adaptative resistance (see Sects. 21.2.3 and 21.2.4). Whether SR proteins are involved in this alternative switch remains largely unknown, but we observed that cisplatin, bevacizumab, and SU5416 increased SRSF2 and SRSF6 protein levels in our cellular models, a result that was consistent with VEGF_{xxx}b accumulation.

In addition, whether chemotherapies and/or anti-angiogenic therapies control the expression level of distinct VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b splice variants from each VEGF-A subfamily remains to be determined.

21.2.3 VEGF-A Splice Variants: Can They Predict Responses to Anti-angiogenic Treatments?

21.2.3.1 The VEGF_{xxx}b/Pan-VEGF Ratio: A Predictive Biomarker of Responses to Bevacizumab

The discovery of the VEGF_{xxx}b subfamily has complicated the simple view that targeting VEGF-A could be beneficial to patients. Hence, VEGF-A was found to encode both “bad” (pro)- and “good” (anti)-angiogenic isoforms, which are both targeted by bevacizumab with the same affinity, leading to the question of whether VEGF-A pre-mRNA splicing is the key to anti-angiogenic therapeutics (Harper and Bates 2008). The first evidence demonstrating that VEGF₁₆₅b expression has an impact on the efficacy of bevacizumab came from the study of Varey and colleagues (Varey et al. 2008), who showed that xenografts in mice derived from human VEGF₁₆₅b-overexpressing colon cancer cells grow more slowly than those bearing VEGF₁₆₅-overexpressing cancer cells. Consistent with an impairment of tumor angiogenesis, the VEGF₁₆₅b-overexpressing xenografts were less vascularized and displayed greater areas of necrosis. More importantly, the authors further demonstrated that the dose of bevacizumab required to prevent tumor growth in VEGF₁₆₅-overexpressing tumors had no effect on the VEGF₁₆₅b-expressing tumors. This in vitro model predicting that bevacizumab would be less efficient in colorectal cancer patients who exhibited an excess of VEGF_{xxx}b over VEGF_{xxx} compared with those with an excess of VEGF_{xxx} was recently validated in situ. In 149 metastatic colorectal cancer patients from the E3200 clinical trial of FOLFOX4 ± bevacizumab, the unadjusted analysis of the progression-free survival (PFS) showed a significantly better outcome for patients with intra-tumoral VEGF₁₆₅b/VEGF_{total} ratio scores below the median treated with FOLFOX4 + BVZ compared with FOLFOX4 alone (Bates et al. 2012). Although these data need to be extended to a larger series of patients and to other tumor types, they suggest that a low VEGF₁₆₅b/VEGF_{total} ratio might be a predictive marker for response to bevacizumab, at least in metastatic colorectal cancer. In addition, studies investigating the predictive potential of VEGF_{xxx}b in response to other anti-angiogenic therapies used clinically, such as VEGFR TKIs, are lacking. As the VEGF_{xxx}b isoforms antagonize VEGFR1/VEGFR2 angiogenic signaling, one might predict that patients with significant levels of VEGF_{xxx}b would be less sensitive to VEGFR TKIs.

Importantly, a lack of correlation between intra-tumoral and plasma VEGF-A protein levels was recently demonstrated (Hegde et al. 2013); however, it is not known to date whether this is also true for VEGF_{xxx}b isoforms. Therefore, both the circulating

and tumoral VEGF_{total} and VEGF_{xxx}b levels should be taken into account when seeking
a correlation between VEGF-A status and tumor response to anti-angiogenic treat-
ments in situ.

21.2.3.2 Plasma Level of Short VEGF-A Isoforms but Not of Total VEGF-A Predicts Outcome After Anti-angiogenic Therapies

In NSCLC and colorectal and renal cell carcinomas, an association between a high
circulating VEGF-A level and a shortened progression-free or overall survival was
recently described, regardless of bevacizumab treatment (Hegde et al. 2013).
Therefore, the plasma levels of total VEGF-A can serve as a prognostic rather than
a predictive marker. However, when an ELISA assay that preferentially detects
short VEGF-A isoforms (VEGF₁₂₁ and VEGF₁₁₁) was used, an association between
high basal plasma levels of VEGF₁₂₁ and improved PFS and/or overall survival (OS)
after bevacizumab treatment was found in breast, pancreatic, and gastric carcinomas
but not in metastatic colorectal, renal, and lung cancers (Lambrechts et al. 2013).
Therefore, VEGF₁₂₁ appears to be a promising candidate biomarker for bevacizi-
zumab response, at least in certain cancers. As previously discussed, the discrepancy
between tumors might reflect a distinct role of the VEGF_{xxx} isoforms depending
on the tumor type and/or chemotherapies combined with anti-angiogenic treatments.
In addition, the use of citrated plasma, which has minimal effect on platelet activa-
tion, rather than EDTA-treated plasma could also affect the results.

21.2.4 VEGF-A Splice Variants as Predictive Biomarkers for Anti-angiogenic Therapies: How Does It Work?

21.2.4.1 Paracrine Effects on Endothelial Cells

Several hypotheses have been proffered regarding VEGF₁₆₅b potential as a predic-
tive biomarker for bevacizumab response. First, it has been proposed that the con-
centration of effective bevacizumab could be lowered in patients with higher
VEGF₁₆₅b concentrations, as more of the antibody is bound to VEGF₁₆₅b and not to
VEGF₁₆₅, thereby diminishing the anti-angiogenic activity of VEGF₁₆₅b while
increasing the amount of free pro-angiogenic VEGF₁₆₅. Conversely, patients with
lower VEGF₁₆₅b levels may have a more angiogenic-progressive tumor than the
high VEGF₁₆₅b group, thereby rendering the tumor more susceptible to bevacizi-
zumab+ FOLFOX (Bates et al. 2012). This more angiogenic profile could also
explain why patients with higher levels of soluble VEGF₁₂₁ are more susceptible to
bevacizumab, as this diffusible short isoform may more accurately reflect the levels
of bioactive VEGF-A and the vascular dependence of the tumor. This hypothesis is
also consistent with another study identifying a VEGF-dependent gene signature

[AU5]

specifically expressed in the tumor vascular compartment in which high expression correlated with enhanced VEGF-A downstream bioactivity and with an increased response to bevacizumab in colorectal cancers (Brauer et al. 2013). Alternatively, as bevacizumab does not prevent interaction between VEGF-A and NRP1 or NRP2, blocking the VEGF-A/VEGFR signaling pathways could induce compensatory mechanisms leading to the activation of VEGF-/NRP-dependent networks. Consistently, it has been shown that anti-NRP1 antibodies have an additive effect on anti-VEGF therapy in reducing tumor growth through vessel normalization (Pan et al. 2007b). As the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms do not display the same affinity for NRP, such a compensatory response to anti-angiogenic therapies could thereby be dependent on the balance between both VEGF-A subfamilies.

21.2.4.2 Autocrine Effects on Tumor Cells

Compared with the large number of publications related to VEGF-A endothelial functions, only a few studies have analyzed its autocrine effects on tumor cells that express VEGFR and/or NRP. Moreover, almost nothing is known regarding the functions of distinct VEGF-A splice variants in this setting. This situation is somewhat surprising because anti-angiogenic therapies, first designed to target endothelial cells, might directly impact the tumors themselves via the regulation of this autocrine loop. Alternatively, VEGF-A-regulated autocrine loops could contribute to primary or acquired resistance to these therapies.

VEGF-A: Not Only a Pro-tumoral Factor in Tumor Cells?

It is currently acknowledged that VEGF-A exerts pro-proliferative/survival functions on tumor cells (Lichtenberger et al. 2010). As an example, the VEGF-A/VEGFR2/NRP1 autocrine loop was found to promote glioma stemlike cell viability and tumor growth and to limit the impact of bevacizumab treatment (Hamerlik et al. 2012). However, recent studies have highlighted unexpected VEGF-A antitumoral functions, increasing the complexity of the approach that blocking VEGF-A would always be beneficial. Indeed, VEGF₁₈₉ was found to induce NRP1-dependent apoptosis in breast cancer cell lines, whereas VEGF₁₆₅ acted as a survival factor (Vintonenko et al. 2011). In addition, the combination of high VEGF-A, VEGFR1, and VEGFR2 protein expression was associated with an improved progression-free survival in early squamous cell carcinoma of the lung in those who are not eligible for bevacizumab treatment owing to severe complications (Pajares et al. 2012). It is noteworthy that this effect was independent of endothelial cells, as no correlation was found between VEGF or its receptors and microvessel density. More strikingly, VEGF₁₆₅ was highlighted as a negative regulator of tumor cell invasion in glioblastoma through the inhibition of c-Met activity (Lu et al. 2012). In resistant glioblastoma patients, bevacizumab increased MET activation and contributed to the emergence of cells with a more invasive phenotype, which

correlated with the expression of mesenchymal markers (Lu et al. 2012; Jahangiri et al. 2013). Taken together, these data highlight the distinct autocrine functions of VEGF_{xxx} splice variants in tumors and their potential as determinants of tumor responses to anti-angiogenic therapies.

VEGF_{165b}: A Pro-invasive Factor in NSCLCs

In human lung adenocarcinoma cell lines and mouse xenografts, we found that bevacizumab treatment triggered a more invasive phenotype that correlated with the activation of both the VEGFR1 and VEGFR2 signaling pathways and with the acquisition of some mesenchymal markers and the secretion of metalloproteases (Boudria et al. in preparation). Importantly, because the specific neutralization of VEGF_{165b} by siRNA was found to reverse the effects mediated by bevacizumab and to inhibit tumor growth, all these effects were dependent on VEGF_{165b}, but not VEGF₁₆₅, expression. Conversely and consistent with VEGF_{165b} controlling a pro-tumoral autocrine loop in NSCLCs, xenografts derived from VEGF_{165b}-overexpressing cells, despite being less angiogenic, grew more rapidly than control tumors and displayed markers of EMT. Altogether, our data support a model in which bevacizumab induces a more invasive phenotype through the activation of a VEGF_{165b}-dependent autocrine loop (Boudria et al. in preparation). Our results are somewhat consistent with the results of Catena and colleagues who showed that the stable overexpression of either VEGF_{121b} or VEGF_{165b} protein in A549 human lung adenocarcinoma cells resulted in a significant increase in tumor development over the controls, even though no significant differences in vascular density were found. Additionally, in prostate PC-3 xenografted tumors, a reduction, as opposed to an increase, in the number of apoptotic cells was observed when VEGF_{xxx}b-overexpressing cells were injected, as compared with controls (Catena et al. 2010). Although we were not able to examine the correlation between VEGF_{165b} status and response to bevacizumab in situ in NSCLC patients, our findings correlate well with our observations associating high VEGF_{165b} protein levels with lymph node metastases in NSCLC. The data also suggested that NSCLC patients with high VEGF_{165b} levels could be less sensitive to bevacizumab, whereas bevacizumab could contribute to the emergence of more invasive tumor cells in patients displaying lower VEGF_{165b} levels. Therefore, the balance between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms also controls the autocrine loops potentially involved in tumor responses to anti-angiogenic therapies.

Taken together, all these studies provide evidence that both VEGF-A-dependent paracrine and autocrine loops must be taken into account when investigating the overall response to anti-angiogenic therapies. In addition, until more details are known regarding the role and expression of distinct VEGF-A splice variants, it should be considered that the impact of anti-angiogenic therapies could be drastically different, even deleterious, depending on the tumor type and/or which VEGF-A splice variant is expressed.

514 **21.2.5 *Pre-mRNA Splicing: A Reservoir of Biomarkers*** 515 ***for Anti-angiogenic Treatments***

516 In addition to VEGF-A, many proteins involved in the angiogenic cascade are
517 alternatively spliced isoforms. As an example, the pre-mRNA alternative splicing
518 of VEGFR1, VEGFR2, or NRP1 generates soluble splice receptors that can, or are
519 predicted to, act as natural inhibitors. Consistent with a role of these splice variants
520 in responses to anti-angiogenic treatments, posttreatment changes in plasma
521 sVEGFR2 were significantly correlated with tumor shrinkage in NSCLC patients
522 treated with pazopanib (Nikolinakos et al. 2010). In addition, sVEGFR1 plasma
523 levels were inversely correlated with the outcome of patients treated with either
524 bevacizumab or anti-VEGFR TKIs in rectal, metastatic colorectal, and breast
525 cancers and hepatocellular carcinoma (Lambrechts et al. 2013). Conversely, low
526 intra-tumoral VEGFR1 expression was found to correlate with improved progres-
527 sion-free or overall survival after bevacizumab delivery in colorectal and gastric
528 carcinomas, respectively. Therefore, it appears that a switch in *VEGFR1* pre-
529 mRNA splicing occurs in tumors and could play a role in the response to anti-
530 angiogenic therapies. Such an effect could be related to a recent study demonstrating
531 that VEGF-A itself induces the expression of sVEGFR1 while leaving expression
532 of the full-length VEGFR1 unchanged in human vascular endothelial cells via a
533 mechanism involving the VEGFR2 protein kinase cMEK signaling pathway
534 (Saito et al. 2013). Although further analyses dissecting the role played by these
535 splice variants during the response to anti-angiogenic therapies are needed, it is
536 likely that pre-mRNA splicing will highlight new potential biomarkers in the future
537 (Fig. 21.4).

538 **21.2.6 *Combining Anti-angiogenic Therapies with Drugs*** 539 ***Targeting the Pre-mRNA Splicing Machinery:*** 540 ***New Therapeutic Strategies in the Future***

541 Based on the above data, one might propose that novel therapeutic strategies com-
542 bining both anti-angiogenic therapies with drugs targeting the pre-mRNA splicing
543 machinery should be developed (Fig 21.4). SRPK inhibitors are among these new
544 drug candidates, as their use is thought to reduce the synthesis of pro-angiogenic
545 isoforms of VEGF-A, consequently decreasing angiogenesis. Consistent with such
546 a hypothesis, selective SRPK inhibitors reduce choroidal neovascularization in vivo
547 when administered topically (eye drop) in rats and mice with exudative age-related
548 macular degeneration (wet AMD) (Gammons et al. 2013). In addition, the injection
549 of SRPIN340, an SRPK1/2 inhibitor, reduced angiogenesis in a mouse model of
550 retinal neovascularization (Nowak et al. 2010). SRPKs could also be a good target
551 in cancer as they are overexpressed in many tumor types compared with normal
552 tissues, including NSCLC (Gout et al. 2012). Indeed, SRPK1 inhibition prevented

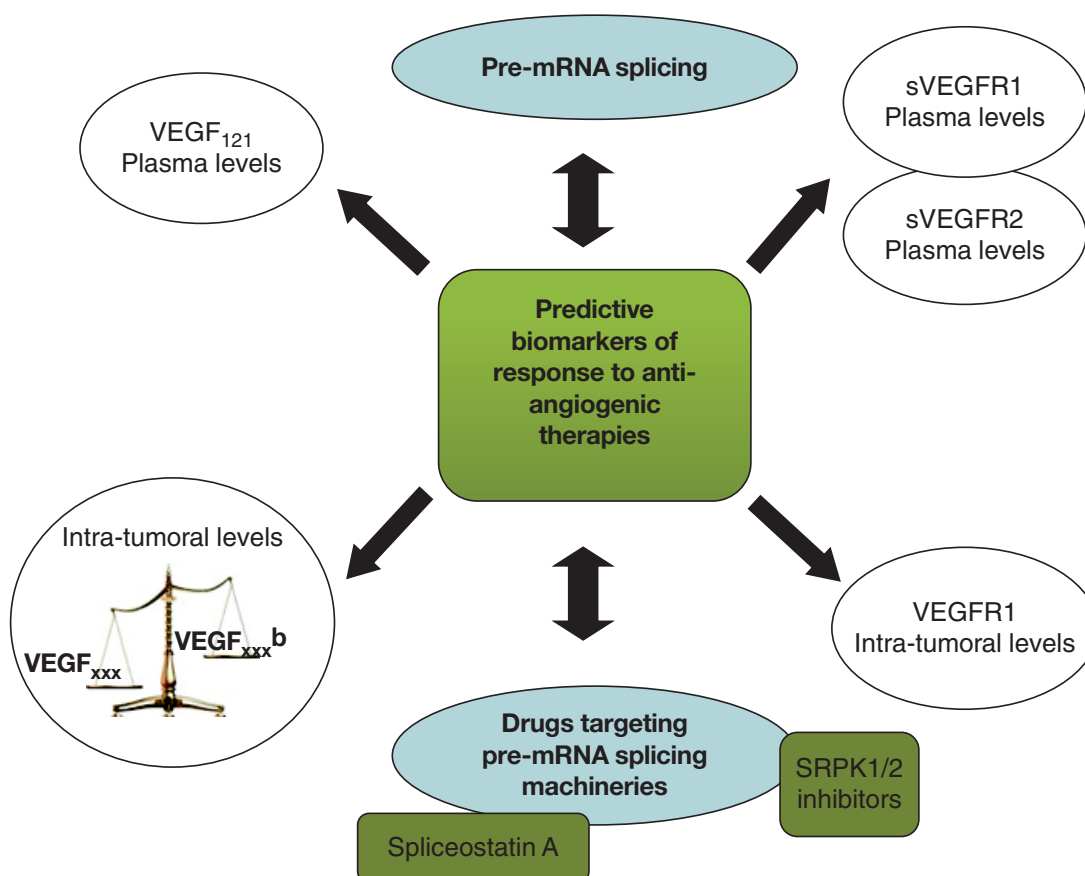


Fig. 21.4 Relationships between pre-mRNA splicing and the response to anti-angiogenic therapies. Pre-mRNA splicing is proposed as a reservoir for predictive biomarkers. New therapeutic strategies combining both anti-angiogenic therapies and drugs targeting the pre-mRNA splicing machineries are illustrated as such a combination that could modulate the expression level of these pre-mRNA splice variants and thereby improve patient outcomes

angiogenesis and associated tumor growth in Wilms' tumors (Amin et al. 2011). Although decreasing the expression of pro-angiogenic VEGF_{xxx} isoforms while increasing that of anti-angiogenic VEGF_{xxx.b} might not always be beneficial (see Sect. 21.2.4), SRPK inhibitors could cooperate with anti-angiogenic therapies to prevent neovascularization and tumor growth in certain tumor types. More generally, pharmacological inhibitors of other components of the spliceosome are currently tested in cancer, one of which, spliceostatin A, was found to block angiogenesis by reducing the total amount of VEGF transcript (Furumai et al. 2010). Therefore, additional experiments are needed to select the most appropriate drug and combination. In addition, further experiments are needed to improve our fundamental knowledge regarding the contribution of pre-mRNA splicing to angiogenesis and response to anti-angiogenic therapies. To this end, the development of new tools/assays that recognize specific VEGF-A splice variants is crucial to clarify what, if any, role distinct VEGF-A splice isoforms have during the tumorigenic process and the response to anti-angiogenic therapies.

568 **References**

- 569 Amin EM, Oltean S, Hua J et al (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis
570 target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20:768–780
- 571 Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G et al (2002) A dynamic shift of VEGF isoforms with a
572 transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis
573 and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6023–6028
- 574 Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE et al (2011) Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 traf-
575 ficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 118:816–826
- 576 Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE et al (2012) Association between VEGF splice isoforms and
577 progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab.
578 *Clin Cancer Res* 18:6384–6391
- 579 Bates DO, Cui TG, Doughty JM et al (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular
580 endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62:
581 4123–4131
- 582 Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG et al (2006) The endogenous anti-angiogenic family of
583 splice variants of VEGF, VEGFxxx, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term.
584 *Clin Sci (Lond)* 110:575–585
- 585 Beazley-Long N, Hua J, Jehle T et al (2013) VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective
586 splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol*
587 183:918–929
- 588 Brauer MJ, Zhuang G, Schmidt M et al (2013) Identification and analysis of in vivo VEGF down-
589 stream markers link VEGF pathway activity with efficacy of anti-VEGF therapies. *Clin Cancer*
590 *Res* 19:3681–3692
- 591 Catena R, Larzabal L, Larrayoz M et al (2010) VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly
592 angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 9:320–327
- 593 Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B et al (2007) Increased expression of VEGF121/
594 VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogene-
595 sis. *Int J Cancer* 120:2096–2109
- 596 Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L et al (2006) A VEGF-A splice variant defective for heparan
597 sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life*
598 *Sci* 63:2067–2077
- 599 Chen TT, Luque A, Lee S et al (2010) Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys
600 differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol* 188:595–609
- 601 Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ et al (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression
602 in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 173:753–759
- 603 Ciura J, Jagodzinski PP (2010) Butyrate increases the formation of anti-angiogenic vascular endo-
604 thelial growth factor variants in human lung microvascular endothelial cells. *Mol Biol Rep* 37:
605 3729–3734
- 606 Cohen CD, Doran PP, Blattner SM et al (2005) Sam68-like mammalian protein 2, identified by
607 digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in
608 splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 16:1958–1965
- 609 Cui TG, Foster RR, Saleem M et al (2004) Differentiated human podocytes endogenously express
610 an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein.
611 *Am J Physiol Renal Physiol* 286:767–773
- 612 David CJ, Manley JL (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and
613 programs unhinged. *Genes Dev* 24:2343–2364
- 614 Delcombel R, Janssen L, Vassy R et al (2013) New prospects in the roles of the C-terminal domains
615 of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation.
616 *Angiogenesis* 16:353–371
- 617 Diaz R, Pena C, Silva J et al (2008) p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression
618 in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J*
619 *Cancer* 123:1060–1067

- Dowhan DH, Hong EP, Auboeuf D et al (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell* 17: 429–439
- Edmond V, Brambilla C, Brambilla E et al (2011a) SRSF2 is required for sodium butyrate-mediated p21(WAF1) induction and premature senescence in human lung carcinoma cell lines. *Cell Cycle* 10:1968–1977
- Edmond V, Moysan E, Khochbin S et al (2011b) Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J* 30:510–523
- Elias AP, Dias S (2008) Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron* 1:131–139
- Fan F, Gray MJ, Dallas NA et al (2008) Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7:3064–3070
- Faure C, Linossier MT, Malaval L et al (2008) Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* 42:1092–1101
- Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581–611
- Furumai R, Uchida K, Komi Y et al (2010) Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF. *Cancer Sci* 101:2483–2489
- Gammons MV, Federov O, Ivison D et al (2013) Topical anti-angiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative-AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:6052–6062
- Gout S, Brambilla E, Boudria A et al (2012) Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One* 7:e46539
- Grepin R, Guyot M, Jacquin M et al (2012) Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 31:1683–1694
- Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R et al (2000) Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 20:7282–7291
- Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H et al (1998) Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9:875–884
- Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R et al (2012) Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med* 209:507–520
- Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 8:880–887
- Hegde PS, Jubb AM, Chen D et al (2013) Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res* 19:929–937
- Houck KA, Ferrara N, Winer J et al (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806–1814
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM et al (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031–26037
- Jahangiri A, De Lay M, Miller LM et al (2013) Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res* 19: 773–1783
- Jingjing L, Xue Y, Agarwal N et al (1999) Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:752–759
- Kawai H, Minamiya Y, Ito M et al (2008) VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 59:41–47
- Kawamura H, Li X, Harper SJ et al (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 68:4683–4692

- 674 Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV et al (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular
675 endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271:7788–7795
- 676 Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO (2007) Alternative splicing in angiogenesis: the vascular
677 endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 249:133–142
- 678 Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S et al (2013) Markers of response for the antiangiogenic agent
679 bevacizumab. *J Clin Oncol* 31:1219–1230
- 680 Li H, Yonekura H, Kim CH et al (2004) Possible participation of pICln in the regulation of angio-
681 genesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs.
682 *Endothelium* 11:293–300
- 683 Li N, Kanda K, Fukumori T et al (2000) Expression of vascular endothelial growth factor isoforms
684 and platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder cancer. *Urol Oncol* 6:10–15
- 685 Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H et al (2010) Autocrine VEGF signaling synergizes
686 with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 140:268–279
- 687 Ljungberg B, Jacobsen J, Haggstrom-Rudolfsson S et al (2003) Tumour vascular endothelial
688 growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progres-
689 sion in human renal cell carcinoma. *Urol Res* 31:335–340
- 690 Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA et al (2012) VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchy-
691 mal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 22:21–35
- 692 Manetti M, Guiducci S, Romano E et al (2011) Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice
693 variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with
694 systemic sclerosis. *Circ Res* 109:e14–e26
- 695 Matsuyama M, Chijiwa T, Inoue Y et al (2009) Alternative splicing variant of vascular endothelial
696 growth factor-A is a critical prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 22:
697 1407–1413
- 698 Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M et al (2010) The transcription factor E2F1 and the SR
699 protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular
700 endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene* 29:5392–5403
- 701 Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP (2008) 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of
702 anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular
703 endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 62:158–163
- 704 Mineur P, Colige AC, Deroanne CF et al (2007) Newly identified biologically active and
705 proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol*
706 179:1261–1273
- 707 Mourah S, Porcher R, Lescaille G et al (2009) Quantification of VEGF isoforms and VEGFR
708 transcripts by qRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *Int J Biol Markers*
709 24:22–31
- 710 Muller YA, Li B, Christinger HW et al (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure
711 and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*
712 94:7192–7197
- 713 Nikolinakos PG, Altorki N, Yankelevitz D et al (2010) Plasma cytokine and angiogenic factor
714 profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung
715 cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res* 70:2171–2179
- 716 Nowak DG, Amin EM, Rennel ES et al (2010) Regulation of vascular endothelial growth factor
717 (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy
718 for angiogenesis. *J Biol Chem* 285:5532–5540
- 719 Nowak DG, Woolard J, Amin EM et al (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of
720 VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 121:3487–3495
- 721 Ohta Y, Endo Y, Tanaka M et al (1996) Significance of vascular endothelial growth factor mes-
722 senger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2:1411–1416
- 723 Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T et al (1998) Expression of cell-associated isoform of vascular
724 endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J*
725 *Oncol* 12:541–544
- 726 Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M et al (2012) Expression of tumor-derived vascular endothelial
727 growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of
728 the lung. *J Clin Oncol* 30:1129–1136

Pan Q, Chanthery Y, Liang WC et al (2007a) Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. <i>Cancer Cell</i> 11:53–67	729 730
Pan Q, Chathery Y, Wu Y et al (2007b) Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. <i>J Biol Chem</i> 282:24049–24056	731 732
Pan Q, Shai O, Lee LJ et al (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. <i>Nat Genet</i> 40:1413–1415	733 734
Peiris-Pages M, Harper SJ, Bates DO et al (2010) Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth. <i>J Pathol</i> 222:138–147	735 736 737
Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y et al (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. <i>Diabetologia</i> 48:2422–2427	738 739 740
Plouet J, Moro F, Bertagnolli S et al (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. <i>J Biol Chem</i> 272:13390–13396	741 742 743
Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y et al (2007) Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. <i>Br J Cancer</i> 97:223–230	744 745
Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S et al (2009) The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. <i>Biochem Soc Trans</i> 37:1207–1213	746 747
Ranpura V, Hapani S, Wu S (2011) Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. <i>JAMA</i> 305:487–494	748 749
Rennel ES, Waine E, Guan H et al (2008) The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. <i>Br J Cancer</i> 98:1250–1257	750 751
Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ et al (2009) VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. <i>Br J Cancer</i> 101:1183–1193	752 753 754
Roskoski R Jr (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. <i>Crit Rev Oncol Hematol</i> 62:179–213	755 756
Saito T, Takeda N, Amiya E et al (2013) VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. <i>FEBS Lett</i> 587:2179–2185	757 758
Schutz FA, Je Y, Richards CJ et al (2012) Meta-analysis of randomized controlled trials for the incidence and risk of treatment-related mortality in patients with cancer treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors. <i>J Clin Oncol</i> 30:871–877	759 760 761
Shi X, Zhao M, Xie WK et al (2013) Inhibition of neovascularization and expression shift of pro-/anti-angiogenic vascular endothelial growth factor isoforms after intravitreal bevacizumab injection in oxygen-induced-retinopathy mouse model. <i>Chin Med J (Engl)</i> 126:345–352	762 763 764
Soker S, Miao HQ, Nomi M et al (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. <i>J Cell Biochem</i> 85:357–368	765 766 767
Tayama M, Furuhashi T, Inafuku Y et al (2011) Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. <i>World J Gastroenterol</i> 17:4867–4874	768 769
Tozer GM, Akerman S, Cross NA et al (2008) Blood vessel maturation and response to vascular-disrupting therapy in single vascular endothelial growth factor-A isoform-producing tumors. <i>Cancer Res</i> 68:2301–2311	770 771 772
Varey AH, Rennel ES, Qiu Y et al (2008) VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. <i>Br J Cancer</i> 98:1366–1379	773 774 775 776
Vincenti V, Cassano C, Rocchi M et al (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. <i>Circulation</i> 93:1493–1495	777 778
Vintonenko N, Pelaez-Garavito I, Buteau-Lozano H et al (2011) Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions. <i>Cell Adh Migr</i> 5:332–343	779 780 781
Wang R, Crystal RG, Hackett NR et al (2009) Identification of an exonic splicing silencer in exon 6A of the human VEGF gene. <i>BMC Mol Biol</i> 10:103–109	782 783

- 784 Woolard J, Wang WY, Bevan HS et al (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial
785 growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endoge-
786 nous protein expression. *Cancer Res* 64:7822–7835
- 787 Yuan A, Lin CY, Chou CH et al (2001) Functional and structural characteristics of tumor angio-
788 genesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-
789 MRI. *PLoS One* 6:e16062
- 790 Zygalki E, Kaklamanis L, Nikolaou NI et al (2008) Expression profile of total VEGF, VEGF
791 splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and
792 non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 41:82–87
- 793 Zygalki E, Tsaroucha EG, Kaklamanis L et al (2007) Quantitative real-time reverse transcription
794 PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and
795 VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non small cell lung cancer. *Clin Chem* 53:
796 1433–1439

Author Queries

Chapter No.: 21 0002109987

Queries	Details Required	Author's Response
AU1	Please check if all occurrences "C-terminal six amino acids" should be changed to "six C-terminal amino acids".	
AU2	Please provide details of "Boudria et al. in preparation" in the reference list.	
AU3	Please check if "C-terminal nine amino acids" should be changed to "nine C-terminal amino acids".	
AU4	Both "FOLFOX4±bevacizumab" and "FOLFOX4+BVZ" have been used in text. Please check if one form should be made consistent.	
AU5	Please check if "bevacizumab+FOLFOX" should be changed to "FOLFOX4±bevacizumab."	

